

## University of Groningen

### Over de preventie van ischemische hersenschade.

Klein, Hans Christiaan

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1992

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Klein, H. C. (1992). *Over de preventie van ischemische hersenschade*. [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

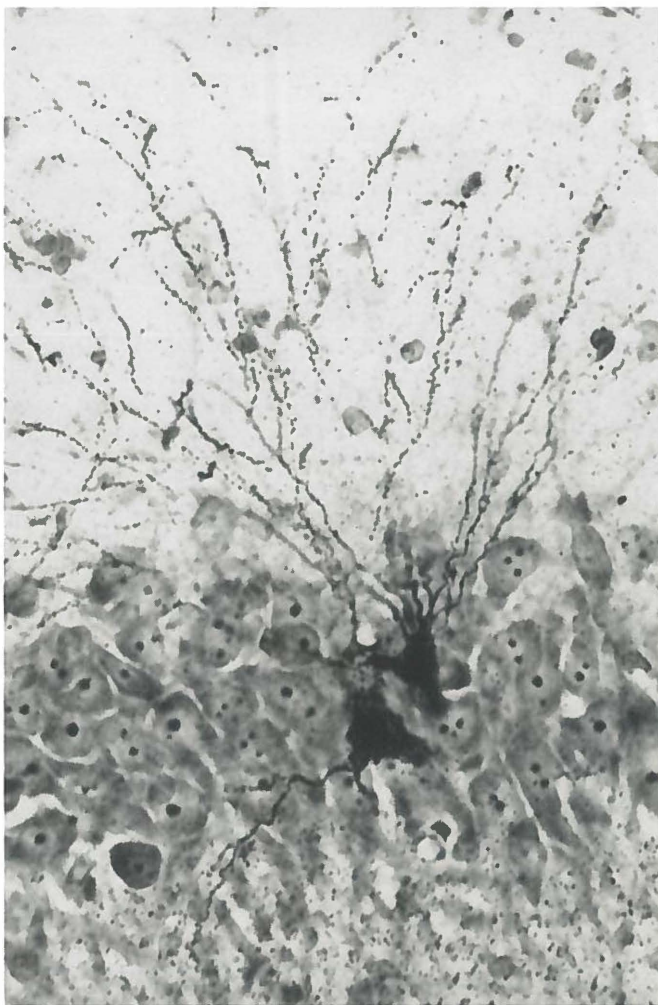
The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## OVER DE PREVENTIE VAN ISCHEMISCHE HERSENSCHADE



HANS C KLEIN

Over de preventie van ischemische hersenschade

On the prevention of ischemic brain damage

Stellingen behorende bij het proefschrift:  
**Over de preventie van ischemische hersenschade**

Processen gedurende de ischemische periode en enkele tientallen minuten erna zijn bepalend voor de mate van beschadiging van de hersenen.

Het feit dat er in hersengebieden met geringe ischemie herhaaldelijke depolarisaties en ion-verplaatsingen kunnen voorkomen, vormt een risico voor het te gronde gaan van dit gebied.

Preventie van ischemische hersenschade is mogelijk via een zodanig geringe verlaging van de glucoseconcentratie in het bloed, dat ongewenste bijwerkingen onwaarschijnlijk zijn.

Ondanks het feit dat de normale hersenactiviteit voornamelijk afhankelijk is van de verbranding van glucose, is glucose onnodig voor het herstel van ion-gradiënten en van elektrische activiteit tijdens de eerste minuten van recirculatie.

Het onderzoek naar de oorzaak en de therapie van hersenschade door een beroerte bij de mens zou zeer sterk vereenvoudigd worden als in een vroeg stadium onherstelbaar beschadigd en niet beschadigd hersenweefsel kan worden onderscheiden.

De normale respons op een beroerte is een pathogene respons.

Ook voor het herseninfarct geldt, dat voorkomen beter is dan genezen.

Het zou bevorderlijk zijn voor een goede werksituatie op de universiteit, als werknemers die langer dan 10 jaar onafgebroken aangesteld zijn bij een vakgroep, van de mogelijkheid gebruik maken gedurende bijvoorbeeld 1 jaar vergelijkbaar werk bij een andere vakgroep te doen.

De alternatieve geneeswijzen worden omringd door een onterecht wetenschappelijk aura.

De minst milieuonvriendelijke besteding is het geven van geld aan natuurbescherming.



RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN

## Over de preventie van ischemische hersenschade

Proefschrift

ter verkrijging van het doctoraat in de  
Geneeskunde  
aan de Rijksuniversiteit Groningen  
op gezag van de  
Rector Magnificus Dr. S.K. Kuipers  
in het openbaar te verdedigen op  
woensdag 1 april 1992  
des namiddags te 4.00 uur

door

Hans Christiaan Klein

geboren op 1 december 1963  
te Leeuwarden

Promotores: Prof. Dr. J. Korf  
Prof. Dr. K. G. Go

*Aan Joan en Chris*



Het verschijnen van dit proefschrift werd mede mogelijk gemaakt door steun van de Nederlandse Hartstichting.

# Inhoud

<b>1. Inleiding in de literatuur</b>	11
1.1. Ischemie bij de mens	11
1.2. Veranderingen tijdens ischemie	12
1.2.1. Metabole veranderingen	12
1.2.2. Verandering van ionen	12
1.2.3. Verandering van neurotransmitters	14
1.2.4. Verandering van choline en fosfolipiden	14
1.2.5. De rol van neuronen en gliacellen bij ischemie	15
1.3. Ischemische schade	15
1.3.1. Selectieve neuronale necrose	16
1.3.2. Infarct	17
1.4. Preventie van ischemische schade	18
1.4.1. Preventie bij de mens	18
1.4.2. Resistentie bij koudbloedige dieren	18
1.4.3. Preventie bij warmbloedige dieren	18
1.5. De diermodellen	19
1.6. Het repetitieve model	20
1.7. Proefopzet	21
<b>2. Veel toegepaste materialen en methoden</b>	23
2.1. Proefdieren en narcose	23
2.2. Operatie	23
2.3. Het repetitieve model	24
2.3.1. De beademing	24
2.3.2. De impedantie meting	25
2.4. Histologische bepaling van de celschade	25
2.5. Kwantificering van de celschade	26
2.6. Statistiek	27

<b>3. Het effect van repetitieve hypoxie op de impedantie, het extracellulair volume en electrolytverschuivingen</b>	29
3.1. Inleiding	29
3.2. Materialen en methoden	29
3.3. Resultaten en commentaar	30
3.4. Conclusies	35
<b>4. De relatie tussen het impedantieverloop en celschade</b>	37
4.1. Inleiding	37
4.2. Materialen en methoden	37
4.3. Resultaten	38
4.3.1. Zilverimpregnatie na 4 uur recirculatie	38
4.3.2. Zilverimpregnatie na 24 uur overleving	44
4.3.3. Hematoxyline-eosine kleuring	46
4.4. Commentaar	47
4.5. Conclusies	48
<b>5. Het effect van een aantal farmaca op het impedantieverloop</b>	49
5.1. Inleiding	49
5.2. Materialen en methoden	49
5.3. Resultaten en commentaar	50
5.4. Conclusies	53
<b>6. Het effect van hersenkoeling, vasten en insuline op het impedantieverloop</b>	55
6.1. Inleiding	55
6.2. Materialen en methoden	56
6.3. Resultaten	57
6.4. Conclusies	61
<b>7. Het effect van vasten en insuline op glucose in bloed en striatum</b>	63
7.1. Inleiding	63
7.2. Materialen en methoden	63
7.3. Resultaten	64
7.3.1. De verandering van glucose in dialysaat.	64
7.3.2. De verandering van glucose in bloed	69
7.3.3. De verandering van de recovery	71
7.4. Conclusies	71

<b>8. Het effect van vasten op het ontstaan van celschade</b>	73
8.1. Inleiding	73
8.2. Materialen en methoden	73
8.3. Resultaten en commentaar	74
8.3.1. Overleving en gedrag	74
8.3.2. Zilverimpregnatie kleuring	74
8.4. Conclusies	76
<b>9. Discussie</b>	79
<b>10. Lijst met afkortingen</b>	85
<b>11. Literatuur</b>	87
<b>12. Samenvatting</b>	101
<b>13. Summary</b>	107
<b>Woorden van dank</b>	112



# 1. Inleiding in de literatuur

## 1.1. Ischemie bij de mens

Hippocrates beschreef 400 v.C. de symptomen van hersenischemie: Doof gevoel en gevoelloosheid, parese van een arm en niet meer kunnen praten (Fields en Lemack, 1989). Deze worden nog steeds tot de meest voorkomende symptomen van hersenischemie gerekend (Vos, 1990). Hersenischemie betekent dat de bloedtoevoer naar een hersengebied afneemt of stopt. Meestal wordt een hersengebied getroffen dat afhankelijk is van de voorziening van de arteria cerebri media (ACM) (Brierley, 1976; Mohr e.a., 1986). Dit vat verzorgt het grootste gedeelte van de pariëtale en temporale cortex, een gedeelte van de frontale en occipitale cortex en de basale kernen. Deze gebieden zijn belangrijk voor spraak en (willekeurige) bewegingen. Vandaar dat ischemie meestal uitval van deze functies veroorzaakt.

Na een ischemische episode is het uiteindelijke verlies van neurologische functies geenszins voorspelbaar. Enerzijds kunnen symptomen verslechteren (Irina e.a., 1983; Price, 1986, Dávalos e.a., 1990). Mogelijk spelen bloeddruk, bloedglucose, bedlegerigheid en daardoor embolievorming en vele andere perifere factoren hierbij een rol (Price, 1986). Vandaar dat bij de behandeling van hersenischemie de normalisering van lichamelijke complicaties een belangrijke plaats inneemt (Greer, 1982; Harper en Castleden, 1990). Anderzijds is het mogelijk dat er spontaan herstel optreedt (Bogouslavski en Regli, 1983; Waxman en O'Toole, 1983; Biller e.a., 1990). De oorzaken hiervan zijn nog niet bekend, maar er wordt gespeculeerd dat er een verbetering van de bloedvoorziening optreedt via ontwikkeling van collateralen, het oplossen van een embolus, of dat er andere hersengebieden zijn die bepaalde functies overnemen.

Tijdens een ischemische episode is er een gebied, dat niet functioneert, maar nog niet onherstelbaar beschadigd is. Dit is de zogenaamde schemerzone, of penumbra in de angelsaksische literatuur (Astrup e.a., 1981; Strong e.a., 1983<sup>ab</sup>; Hakim, 1987). Door bijvoorbeeld de bloeddruk te verhogen, kan bij de mens dit gebied tijdelijk worden 'geactiveerd' (Olsen e.a., 1983). Verbetering van symptomen zou ontstaan door het functionele herstel van een gedeelte van de penumbra. Het klinische herstel is het grootst tijdens de eerste minuten na de episode. Van de mensen die een TIA (transient ischemic attack) hebben, d.w.z. binnen één dag volledig herstellen, heeft maar liefst 25 % zich binnen 5 minuten hersteld, 50 % binnen 30 minuten en 60 % binnen een uur (Fieschi e.a., 1983; Levy, 1988). De symptomen van monoculaire ischemie en ventrobasilair ischemie duurden in respectievelijk 75 % en 65 % van de patiënten korter dan 10 minuten (Fisher,

1987). Als er functioneel herstel van de penumbra optreedt, geschiedt dit in de regel zeer snel.

In deze inleiding worden de effecten van ischemie op de cellulaire "huishouding" besproken. Allereerst worden de veranderingen besproken, die altijd optreden bij ischemie (zie figuur 1.1), daarna de veranderingen die uitsluitend optreden als de hersenen beschadigd raken. Vervolgens worden behandelingen genoemd, die de hersenen tegen beschadiging kunnen beschermen. Er worden diverse diermodellen voor het opwekken van ischemie genoemd en er wordt een model voor herhaaldelijke ischemie geïntroduceerd. Als laatste wordt de proefopzet gegeven voor de experimenten met repetitieve ischemie.

## **1.2. Veranderingen tijdens ischemie**

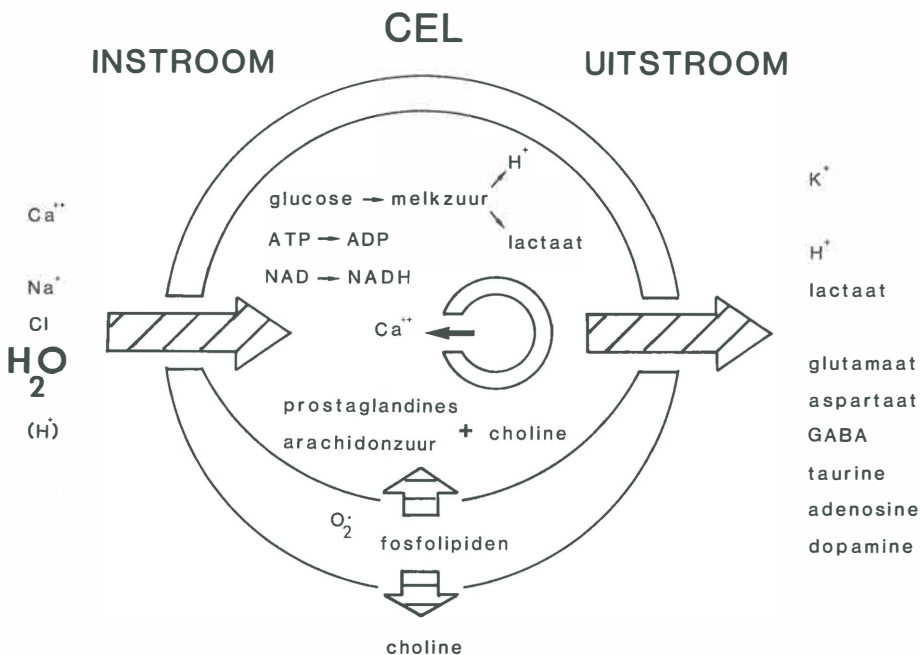
### *1.2.1. Metabole veranderingen*

Bij volledige ischemie door bijvoorbeeld hartstilstand raakt het intracellulaire zuurstof binnen enkele seconden op (Gercken en Preuss, 1969; review van metabole veranderingen: Siesjö, 1978). Daardoor kan NADH niet meer geoxideerd worden en stijgt de concentratie intracellulair. Er is een geringe reserve van ATP ( $\pm 3$  mmol/kg), een iets grotere reserve van creatinefosfaat ( $\pm 5$  mmol/kg) en er kan een nog grotere hoeveelheid ATP ( $\pm 10$  mmol/kg) gemaakt worden uit anaërobe verbranding van glucose ( $\pm 3$  mmol/kg) en een geringe hoeveelheid glycogeen van  $\pm 2$  mmol/kg.

Uit cerebraal (bloed)glucose wordt 10 mmol/kg melkzuur gevormd (Ljunggren e.a., 1974). Deze omzetting vindt versneld plaats, omdat het enzym fosfofructokinase wordt gestimuleerd (Pasteur effect) o.a. door verlaging van ATP (Siesjö, 1978). Melkzuur valt snel uiteen in  $H^+$  en lactaat (melkzuur-anion). De celmembraan is slecht doorlaatbaar voor lactaat, dat daarom vooral intracellulair aanwezig blijft (Kuhr e.a., 1988).  $H^+$  verlaat de cel via een carrier en is extracellulair verhoogd (Nedergaard e.a., 1990).

### *1.2.2. Verandering van ionen*

De concentraties van ATP en creatinefosfaat dalen naar een minimum in  $\pm 2$  minuten. Daardoor gaan geleidelijk een aantal cerebrale functies verloren. Er treedt een geleidelijke stijging op van extracellulair  $K^+$  (Branston e.a., 1982; Harris en Symon, 1984; Hansen, 1985) en binnen 20 seconden is het EEG isoëlectrisch (Hossmann, 1971). Men denkt dat de verandering van  $K^+$  veroorzaakt wordt door een stijging van de intracellulaire  $Ca^{2+}$  concentratie en daardoor  $Ca^{2+}$  afhankelijke  $K^+$  kanalen opengaan (Uematsu e.a., 1988; Silver en Erecińska, 1990).



*Figuur 1.1. Schematische weergave van een aantal veranderingen tijdens ischemie. Het tijdsverloop van de veranderingen wordt genoemd in hoofdstuk 1.2*

Na 1-2 minuten treedt plotseling een massale verplaatsing op van ionen tussen de intracellulaire en extracellulaire ruimte. De ionen verplaatsing wordt veroorzaakt doordat op dat moment de ionpompen falen (na daling van ATP, Naritomi e.a., 1988) en vele ionkanalen opengaan. Ionkanalen gaan open door verandering van het membraanpotentiaal en verhoging van intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$ . Intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$  kan stijgen door uitstoot van  $\text{Ca}^{2+}$  uit celorganellen (Siesjö en Bengtsson 1990). Uiteindelijk kunnen zich ionen over de celmembraan verplaatsen als gevolg van membraanrek door zwelling van de cel (Yang en Sachs, 1989).

De richting waarin de ionen zich verplaatsen is afhankelijk van de concentratiegradiënt en het potentiaalverschil over de celmembraan (Hansen, 1985).  $\text{H}^+$  gaat initieel naar binnen door het potentiaalverschil (alkalotische shift), maar als de depolarisatie voortzet volgt  $\text{H}^+$  de concentratiegradiënt en gaat naar buiten (Kraig e.a., 1983; Harris en Symon, 1984).  $\text{K}^+$  gaat naar buiten en  $\text{Cl}^-$  naar binnen (concentratiegradiënt) en  $\text{Na}^+$  en  $\text{Ca}^{2+}$  gaan naar binnen door de concentratie en potentiaalgradiënt (Collewyn en Schadé, 1964;



Hansen en Zeuthen, 1981; Yamaguchi, 1986).

Omdat de concentratie ionen extracellulair groter is dan intracellulair gaan er netto meer ionen naar binnen dan naar buiten en treedt water de cel binnen door osmotisch transport (Van Harreveld, 1972). Er treedt celzwellings op ten koste van het extracellulaire volume (ECV). De extracellulaire ruimte is ongeveer 20 % van het totale hersenvolume en daalt tijdens ischemie naar  $\pm 10$  % van het hersenvolume (Hossmann, 1971; Van Harreveld 1972; Matsuoka en Hossmann, 1982). De daling van het ECV werd bepaald met impedantiemeting (Van Harreveld en Ochs, 1956; Hossmann, 1971; Matsuoka en Hossmann, 1982), diffusie van choline en tetramethylammonium (Hansen en Olsen, 1980), elektronen microscopie (Van Harreveld, 1972) en lichtverspreiding (Lipton, 1973).

### *1.2.3. Verandering van neurotransmitters*

Onder fysiologische omstandigheden worden neurotransmitters geconcentreerd in vesikels in de synaps. Door actieve heropname uit de synapsspleet blijft de extracellulaire concentratie laag. Tijdens ischemie worden neurotransmitters die in de extracellulaire ruimte terecht komen niet meer opgenomen. Wij hebben het effect van hartstilstand op de uitstoot van aminozuren in een lokaal ingebrachte microdialyse slang onderzocht (Korf e.a., 1988). Na 2 minuten ischemie was de extracellulaire concentratie van de excitatoire transmitters glutamaat en aspartaat en van de inhibitoire transmitters GABA (gamma-aminohydroxybutyraat) en taurine in het striatum in geringe mate, maar significant verhoogd. Na 15 minuten was er een stijging van extracellulair glutamaat (+ 460 %), aspartaat (+ 270 %) en een relatief sterkere stijging van GABA (+ 620 %) en taurine (+ 970 %). In andere studies wordt beschreven, dat ook de inhiberende transmitters adenosine (+ 1900 %, Hagberg e.a., 1987) en dopamine (+ 38000 %, Globus e.a., 1988) tijdens ischemie zeer sterk verhoogd zijn. Heropname van neurotransmitters geschiedt voornamelijk door co-transport met  $\text{Na}^+$  (Kanner en Sharon, 1978). Tijdens de eerste minuten van ischemie is er blijkbaar op deze manier nog enige heropname mogelijk. Vooral glutamaat en aspartaat, de potentieel toxische neurotransmitters, lijken van  $\text{Na}^+$  afhankelijke heropname te profiteren.

### *1.2.4. Verandering van choline en fosfolipiden*

In de hersenen vindt een constante productie van choline plaats, dat via het bloed wordt afgevoerd (Dross en Kewitz, 1972). Choline is de precursor voor de transmitter acetylcholine en komt veel voor gebonden aan fosfolipiden van de celmembraan. Tijdens ischemie stijgt de concentratie van choline in weefsel in het algemeen (Scremin en Jenden, 1989<sup>b</sup>) en extracellulair in het bijzonder (Scremin en Jenden, 1989<sup>a</sup>). Dit geschiedt mogelijk door verminderde afvoer via het bloed, verminderde omzetting tot acetylcholine en afbraak van

membraanfosfolipiden.

Bij de afbraak van membraanfosfolipiden komen bovendien vetzuren vrij (voornamelijk arachidonzuur). Deze stof kan de membraanpermeabiliteit voor ionen en transmitters vergroten (Demopoulos e.a., 1980), mitochondriale enzymen remmen (Ramakrishna Kurup e.a., 1990) en kan worden omgezet tot prostaglandines, die een nog groter effect hebben op membraanpermeabiliteit (Demopoulos e.a., 1980). Deze omzetting gebeurt alleen in de aanwezigheid van zuurstof, tijdens recirculatie en/of partiële ischemie. Uit zuurstof worden vrije radicalen gevormd ( $O_2\cdot$ ), die de gehele cascade van cel(membraan)destructie in gang zetten.

#### *1.2.5. De rol van neuronen en gliacellen bij ischemie*

Alle beschreven effecten van ischemie treden in neuronen en gliacellen op. De gliacellen hebben echter een kwantitatief verschillend metabolisme dan neuronen. Tijdens ischemie kunnen gliacellen veel acidotischer worden dan neuronen (Kraig en Chesler, 1990), zij zwellen meer op dan neuronen na verhoging van extracellulair  $K^+$  (Hertz, 1981), ze zijn afhankelijker van anaërobe stofwisseling, de stofwisseling is  $\pm 3$  maal hoger dan die van neuronen in vitro (Walz en Mukerji, 1988), de  $Na^+/K^+$  ATPase activiteit is hoger (Grisar e.a., 1978) en de opname van glutamaat is in vivo hoger (McLennan, 1976) en dus is de rol voor het herstel van gradiënten belangrijker dan bij neuronen.

### **1.3. Ischemische schade**

Een kenmerk van een ischemische episode is, dat schade aan neuronen gedurende een lange recirculatieduur ontstaat. Bij hypoglycemie of epilepsie is schade binnen enkele uren te zien. Na ischemie is er een recirculatie periode van dagen nodig om neuronale necrose aan te kunnen tonen (Auer en Siesjö, 1988). Bovendien zijn na ischemie andere gebieden beschadigd dan na andere soort episodes (Auer en Siesjö, 1988). Na ischemie is het contralaterale striatum vaak beschadigd en na epilepsie nooit. Ischemie beschadigt de reticulaire thalamus, hypoglycemie en epilepsie niet. Ischemie kenmerkt zich dus doordat het langzaam schade veroorzaakt en doordat het specifieke gebieden beschadigt. Wanneer de duur van de ischemie vergroot wordt, breidt de schade zich uit van neuronen naar gliacellen en is er uitbreiding vanuit de gevoelige gebieden naar minder gevoelige gebieden (Pulsinelli e.a., 1982<sup>a</sup>; Tomida e.a., 1987; Lin e.a., 1990; Minamisawa e.a., 1990; Selman e.a., 1990). Als gliacellen en neuronen zijn aangedaan is er sprake van een infarct. Als alleen neuronen zijn beschadigd, van selectieve neuronale necrose.

### *1.3.1 Selectieve neuronale necrose*

Er is veel onderzoek gedaan naar de effecten van een korte ischemische periode van 2-10 min. Bij kortdurende ischemie worden alleen pyramidecellen (neuronen) in het CA1 gebied van de Sommerse sector van de hippocampus beschadigd. De pyramidecellen worden gekenmerkt door een rijke bezetting met glutamaat-receptoren van het NMDA (N-Methyl-D-Aspartaat) type. Als tijdens ischemie glutamaat wordt uitgestort over de receptor, komen  $\text{Na}^+$  en  $\text{Ca}^{2+}$  de cel in (Benveniste e.a., 1988) en treedt depolarisatie op. Selectieve neuronale necrose wordt voorkomen door de receptor te blokkeren met AP7 (2-amino-7-fosfo heptanoate, Swan e.a., 1988), of MK-801 (Church e.a., 1988; Gill e.a., 1988), door de glutamaat uitstoot te voorkomen door het doorsnijden van de Schaffer collateralen (Benveniste e.a., 1988; Kaplan e.a., 1989), door de glutamaat uitstoot te verlagen met hypothermie (Busto e.a., 1989; Buchan en Pulsinelli, 1990; Minamisawa e.a., 1990; Chopp e.a., 1991) en door blokkade van het voltage-afhankelijke  $\text{Ca}^{2+}$  kanaal met Nimodipine (Lazarewicz e.a., 1989; Uematsu e.a., 1989). In vitro kan schade worden voorkomen door het medium  $\text{Ca}^{2+}$ -vrij te maken (Choi, 1985 en 1987). Bij selectieve neuronale necrose lijkt de  $\text{Ca}^{2+}$  instroom dus een belangrijke rol te spelen. Als  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulair verhoogd is, worden diverse second-messenger systemen geactiveerd, die de intracellulaire calciumspiegel verder verhogen, de glutamaat uitstoot verder verhogen, het cytoskelet en membranen van cel en organellen afbreken (Siesjö en Bengtsson, 1990; Choi, 1990) en uiteindelijk via endonucleasen het DNA beschadigen (Lockshin en Zakeri, 1990).

In vitro kan necrose worden voorkomen door neuronen te verzuren met lactaat (Giffard e.a., 1990; Tombough e.a., 1990). Celdepolarisatie wordt geblokkeerd bij lage pH (Walz en Harold, 1990). Het toedienen van de gangbare glutamaatreceptorblokkers geeft dan geen extra bescherming meer. Dit impliceert dat in gebieden waar lactacidose optreedt glutamaat geen rol speelt bij beschadiging. Daarbij past de bevinding, dat schade in vivo uitblijft in vele gebieden waarin tijdens ischemie glutamaat uitstoot plaats vindt (Globus e.a., 1990). Na een korte ischemische periode in vivo is er praktisch volledige normalisering van lactaat, ATP en Creatine fosfaat (Siesjö, 1978; MacMillan, 1982), EEG, electrolyten en extracellulaire volume (Hossmann e.a., 1977; Branston e.a., 1982; Yamaguchi, 1986; Uematsu e.a., 1988) en extracellulaire transmitter concentraties van dopamine glutamaat en GABA (Globus e.a., 1988) en adenosine (Hagberg e.a., 1987). Kortom, ondanks herstel van het metabolisme zijn er specifieke veranderingen in de neurotransmissie, die selectieve neuronale necrose veroorzaken.

### 1.3.2. Infarct

Na langdurige ischemie ontstaat er een gebied met dode neuronen en gliacellen, een infarct. Gedurende de eerste uren van recirculatie is dit gebied gekenmerkt door een vlak EEG (Uematsu e.a., 1988), lactacidose en daling van ATP (Rehncrohn e.a., 1981; Gardiner e.a., 1982), intracellulaire ophoping van  $\text{Ca}^{2+}$  (Dienel, 1984; Hossmann, 1985; Uematsu e.a., 1988), oedeem (Kato e.a., 1986; Tomida e.a., 1987; Abe e.a., 1988; Vass e.a., 1988) en later beschadiging van de bloed-hersenbarrière (BHB) (Ito e.a., 1976; Picozzi e.a., 1985; Vass e.a., 1988). Vaak treedt irreversibele celzwellings op (De Boer e.a., 1989).

Het aanbod van glucose en de omzetting ervan in lactaat lijkt een belangrijke rol te spelen bij het ontstaan van het infarct. In het dierexperimentele model van reversibele ernstige ischemie geeft een korte episode bij normale glucose spiegel geringe schade. Wanneer voor de episode een grote dosis glucose wordt toegediend, ontstaat ernstige schade (Kalimo e.a., 1981; Pulsinelli e.a., 1982; Dienel, 1984; Nedergaard en Diemer, 1987; Hoffmann e.a., 1990). Bovendien is er meer neurologische uitval (Siemkowicz en Hansen, 1978; Siemkowicz, 1985; Lundy e.a., 1987; Vázquez-Cruz e.a., 1990), slechter herstel van het EEG (Siemkowicz en Hansen, 1978), slechter herstel van doorbloeding en glucose metabolisme (Ginsberg e.a., 1980), meer lactaat ophoping en minder ATP (Rehncrohn e.a., 1981; Gardiner e.a., 1982; Welsh e.a., 1983), meer oedeem en accumulatie van  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  en verlies van  $\text{K}^+$  (Warner e.a., 1987) en meer accumulatie van  $\text{Ca}^{2+}$  (Dienel, 1984; Warner e.a., 1987). Bij patiënten met hyperglycemie is het oedematische hersengebied groter (Berger en Hakim, 1986), is het neurologische herstel slechter (Pulsinelli e.a., 1983; Woo e.a., 1988; Dávalos e.a., 1990) en is de verstoring van cerebraal glucose metabolisme groter (Kushner e.a., 1990). De hoeveelheid melkzuur die zich tijdens volledige ischemie ophoopt is direct gerelateerd aan de bloedglucose concentratie voor de episode (Ljunggren e.a., 1974). Melkzuuracidose veroorzaakt schade aan gliacellen en neuronen in vitro (Goldman e.a., 1989). Ook in vivo lijkt lactacidose een belangrijke oorzaak voor het ontstaan van een infarct.

## 1.4. Preventie van ischemische schade

### 1.4.1. Preventie bij de mens

In een aantal specifieke omstandigheden is preventie bij de mens mogelijk bij bepaalde risicogroepen. Hiertoe behoren met name die mensen, die al een TIA (tijdelijke ischemie) of infarct hebben gehad. Bij sommige patiënten met een stenose van één carotis arterie kan een vaatoperatie de prognose verbeteren (Greer, 1982). Als een vaatafsluiting wordt veroorzaakt door een uit het hart afkomstige embolus, kan ontstolling recidieven voorkomen. Na een TIA verlaagt aspirine de kans op recidief van een TIA en een infarct bij  $\pm 6\%$  van de patiënten. Of deze medicijnen werkelijk effectief zijn is op dit moment nog niet zeker (Harper en Castleden, 1990). Daarentegen is het duidelijk, dat hypothermie en diepe anesthesie bij de mens hersenschade voorkomen, een bevinding waar al lange tijd gebruik van wordt gemaakt bij vaatoperaties (Lougheed, 1955).

### 1.4.2. Resistentie bij koudbloedige dieren

Koudbloedige dieren overleven uren van zuurstof-onthouding (anoxie) zonder schadelijke gevolgen. Het metabolisme van bijvoorbeeld de duikende schildpad is aangepast aan de anoxische toestand. Er is een voorraad glycogeen in de hersencellen. Het zuurstofverbruik is laag, dankzij een membraanpermeabiliteit die 3 maal lager is voor  $K^+$  en 8 maal lager voor  $Na^+$  vergeleken met de rat (Else en Hulbert, 1987). Na anoxie daalt de omzetting van glucose in de cel door regulering van fosfofructokinase (Storey, 1987; Brooks en Storey, 1988), glucose wordt relatief minder tot melkzuur en meer tot succinaat en andere producten verbrand, waardoor de verzuring wordt voorkomen (Hochachka en Mommsen, 1983) -een aanpassing die ook voorkomt bij sommige voor anoxie ongevoelige planten- (Crawford, 1978; Menegus e.a., 1989). Dankzij deze metabole aanpassing is er voldoende ATP intracellulair beschikbaar voor het in stand houden van ion-gradiënten over de celmembraan (Lutz e.a., 1984; Chih e.a., 1989). Doordat massale ion-verplaatsingen worden voorkomen (Doll e.a., 1991), worden de hersenen niet beschadigd.

### 1.4.3. Preventie bij warmbloedige dieren

Bij warmbloedige dieren kan het celmetabolisme worden aangepast door afkoeling. Hypothermie beschermt tegen ischemische hersenschade in vele diersmodellen (Berntmann e.a., 1981; Young e.a., 1983; Busto e.a., 1987; Natale e.a., 1989; Buchan en Pulsinelli, 1990). Tijdens hypothermie zijn de ion-stromen vertraagd (DeBoer e.a., 1989; Morris e.a., 1991), de uitstoot van neurotransmitters verminderd (Busto e.a., 1989) en is er een vertraging van de depletie van ATP en verminderde ophoping van melkzuur (Tanimoto en Okada, 1987). Men moet voorzichtig zijn met het toepassen van langdurige hypo-

thermie, vanwege schadelijke effecten (Michenfelder en Milde, 1977; Steen e.a., 1979).

Vasten bleek bij een korte ischemische periode selectieve neuronale schade te voorkomen (Marie e.a., 1990) en bij hypoxie-ischemie BHB beschadiging te voorkomen (Go e.a., 1988). Door vasten daalt de bloedconcentratie van glucose (Ruderman e.a., 1974) en insuline (Strubbe en Alingh Prins, 1986) en stijgen ketonlichamen (Ruderman e.a., 1974; Go e.a., 1988).

Insuline verlaagt eveneens de glucose spiegel. Injectie van  $\pm 4$  eenheden /kg lichaamsgewicht beschermt tegen geheugendefecten (Strong e.a., 1990), tegen mitochondriale dysfunctie (Strong e.a., 1985), tegen ruggemerschade (Robertson en Grossmann, 1987) en tegen neurologische uitval (LeMay e.a., 1988).

Medicijnen die ingrijpen op neurotransmissie en ion stromen werken in sommige modellen beschermend (Germano e.a., 1987; Meyer e.a., 1987; Oyzurt e.a., 1988; Park e.a., 1988; Prenen e.a., 1988; Januzciewicz e.a. 1989; Olney e.a., 1989). Tot slot wordt er in de literatuur vermeld, dat hersenschade kan worden voorkomen door het remmen van de vorming van vrije zuurstof radicalen (Palmer e.a., 1985; Joshita e.a., 1989).

## 1.5. De diermodellen

Voor het onderzoek naar de oorzaken van ischemische schade is een goed diermodel onontbeerlijk. Bij de keuze van het model is een aantal theoretische en praktische overwegingen mogelijk. Ginsberg heeft in een recent overzichtsartikel de overwegingen uitgebreid behandeld (Ginsberg en Busto, 1989). Er is grofweg onderscheid tussen modellen met focale ischemie als gevolg van een permanente afsluiting van een klein vat en globale ischemie als gevolg van een reversibele afsluiting van een groot vat.

Het focale ischemiemodel zit het dichtst bij het klinische equivalent van de onbloedige vaatafsluiting, maar heeft een aantal nadelen. De grootte van het ischemisch gebied is zeer variabel (Crowell e.a., 1981), er zijn dus grote aantallen dieren nodig om een effect aan te tonen. Het model is dus niet geschikt om te screenen op preventie mogelijkheden. Er is bovendien een groot gebied met irreversibele schade en een klein gebied waar herstel eventueel mogelijk is (penumbra). Onderzoek naar de factoren die het herstel bevorderen is dus moeilijk.

Bij de modellen van globale ischemie is er keuze tussen complete (=diepe) ischemie en incomplete ischemie. Voor het induceren van complete ischemie worden meestal alle 4 vaten in de hals en nek geoccludeerd. Eerst worden de beide arteriae vertebrales dichtgeschroeid, en na een dag worden beide carotis arteriën geligeerd. De voordelen van dit model zijn, dat het bij dieren onder bewustzijn kan geschieden en dat het veel lijkt op de

klinische tegenhanger van de acute hartstilstand. Nadelen zijn de grote variabiliteit van hersenschade, veel mislukte operaties (> 25 %) en een hoge mortaliteit (> 50 %).

Het meest gebruikte model van incomplete ischemie is het 2 vaten occlusie model. Beide arteriae carotis worden afgeklemd en tegelijkertijd de bloeddruk verlaagd tot  $\pm 50$  mm Hg. Daardoor ontstaat ischemie in de voorhersenen. Het is moeilijk de bloeddruk reproduceerbaar te verlagen. Dit is een belangrijk praktisch nadeel in een repetetief model (zie verder). In woestijnratten is door uitsluitend de beide vaten af te sluiten ischemie op te wekken. Een nadeel is, dat woestijnratten een te klein bloedvolume hebben voor regelmatige afname van bloed voor bepaling van bloedgasen en glucose.

In het gemodificeerde (DeBoer e.a., 1989) Levine model (Levine, 1960) wordt éénzijdig de arteria carotis afgesloten, en wordt de rat beademd met 10 % zuurstof, waardoor de bloeddruk daalt en er éénzijdig een hypoxie en relatieve ischemie optreedt. Nadeel van het model is, dat de mate van ischemie varieert tussen hersenstructuren. Voordelen zijn, dat de operatie en het opwekken van ischemie eenvoudig is, dat de ernst van de neuronale schade reproduceerbaar is en dat vooral het klinisch relevante ACM gebied wordt getroffen (Salford en Siesjö, 1974; Ginsberg e.a., 1976). Omdat ischemie en schade éénzijdig optreedt (Salford e.a., 1973), is er minder kans op mortaliteit tijdens en na de episode in vergelijking met bilaterale ischemie.

## 1.6. Het repetitieve model

Zoals al vermeld in het begin van de inleiding, is het herstel van de cerebrale functies afhankelijk van het herstel van de penumbra. In de penumbra treden herhaalde veranderingen op van de extracellulaire  $K^+$  concentratie (Strong e.a., 1983<sup>a</sup>). Op de duur stijgt  $K^+$  irreversibel. In een vroeg stadium van ischemie zijn in de penumbra kleine gebieden ernstig beschadigd (micro-infarct, Strong e.a., 1983<sup>b</sup>). Mogelijk veroorzaakt het irreversibele karakter van ion-stromen de beschadiging.

De meting van extracellulair  $K^+$  is beperkt tot een zeer klein gebied om de electrode. Bij ischemie wordt een groot gebied blootgesteld aan verplaatsing van ionen en water. Om de verandering in een bepaalde hersenstructuur te meten, is een globale meetmethode meer op zijn plaats. Bij de impedantiemeting wordt de mate van celzwellling (instroom van water als gevolg van ion-instroom) in een gebied van enkele mm<sup>3</sup> tussen twee electrodes gemeten. De veranderingen in het striatum zijn representatief voor de ischemische veranderingen in de rest van het ACM gebied (Ginsberg e.a., 1976). Om het effect van ischemie op ion-stromen en (irreversibele) celzwellling te onderzoeken is in onze experimenten de impedantie in het striatum gemeten.

Er is een repetitief model gebruikt om -in analogie met de penumbra- door repetitieve veranderingen van ion-stromen, een infarct te doen ontstaan. De resultaten van repetitieve hypoxie-ischemie zijn niet volledig toepasbaar op de veranderingen in de penumbra, omdat de ionen in de penumbra iets sneller veranderen. Bovendien is de verandering van energiemetabolisme, doorbloeding en neurotransmissie niet noodzakelijkerwijs hetzelfde in beide toestanden. Het repetitief model is voornamelijk ontwikkeld om de oorzaken en preventiemogelijkheden van hersenschade te onderzoeken. Voordeel van het model is, dat het eindcriterium -de irreversibele impedantiestijging- eenvoudig, ondubbelzinnig en snel te bepalen is. Als een bepaalde ingreep bescherming biedt wordt dit snel duidelijk. Daarom is het model geschikt voor screening van beschermingsstrategieën. In een repetitief model krijgen factoren, die een rol spelen bij beschadiging, de kans progressief te veranderen. Het aantonen van de progressie van een factor gedurende een aantal hypoxie periodes is een nieuwe gevoelige methode om de oorzaken van hersenschade te bepalen.

### **1.7. Proefopzet**

Ratten met een éénzijdige carotis occlusie werden herhaaldelijk gedurende 10 minuten beademd met 10 % O<sub>2</sub> (hypoxie-ischemie) en tijdens tussenpozen van 10 minuten met 30 % O<sub>2</sub> (normoxie-recirculatie). Wanneer er irreversibele impedantievarandering (IV) in het striatum optrad, werd permanente recirculatie gegeven.

Het beschreven model is geschikt voor onderzoek, als de veranderingen tijdens en na repetitieve hypoxie reproduceerbaar zijn. Bovendien moet irreversibele IV na een vast aantal hypoxie periodes optreden en duidelijk grotere schade veroorzaken dan reversibele zwelling. De validering van het model geschiedt in hoofdstuk 3 en 4. In hoofdstuk 3 worden veranderingen van bloeddruk, bloedgassen en pH, extracellulair volume, cerebraal Na<sup>+</sup> en K<sup>+</sup>, en de schade aan de bloed-hersen barrière beschreven. In hoofdstuk 5 wordt de rol van IV bij celschade, morbiditeit en mortaliteit behandeld.

In het repetitieve model is op eenvoudige wijze te bepalen of een ingreep tegen irreversibele IV beschermt. Bij bescherming zal irreversibele IV later, of geheel niet optreden. Hoofdstuk 5 behandelt de ingrepen met medicijnen, die van invloed zijn op IV door ionkanalen te blokkeren, receptoren te blokkeren, vasoconstrictie te voorkomen en vorming van schadelijke radicalen te voorkomen. Hoofdstuk 6 behandelt de effecten van hersenkoe-ling, 48 uur vasten en insuline, ingrepen die het metabolisme beïnvloeden.

Het bleek, dat vasten de resistentie tegen irreversibele IV dramatisch verhoogde. In hoofdstuk 7 wordt behandeld in hoeverre het glucosemetabolisme hierbij een rol speelt. De veranderingen van extracellulair glucose in het striatum werden continu gemeten en



vergeleken met de veranderingen van glucose in het bloed.

Er is onderzocht of vasten eveneens hersenschade voorkomt, die gewoonlijk gedurende lange tijd ontstaat. Er is gekozen voor het geven van twee episodes hypoxie-ischemie, waarbij op den duur ernstige neuronale schade optreedt, maar er toch een relatief geringe mortaliteit is. De mate van morbiditeit, mortaliteit en neuronale schade, die 24 uur na de episodes ontstaat, is onderzocht. In hoofdstuk 8 wordt het effect van vasten op deze parameters van hersenschade beschreven.

In de discussie zullen de implicaties van het repetitieve model en de daarmee gevonden beschermingmaatregelen worden genoemd. Er zal uitvoerig worden ingegaan op de mogelijke effecten van behandelingen op het cellulaire metabolisme. Er wordt gespeculeerd over de toepasbaarheid van de bevindingen op de klinische situatie.

## **2. Veel toegepaste materialen en methoden**

### **2.1. Proefdieren en narcose**

Voor alle experimenten zijn mannelijke Wistar-ratten gebruikt van 200-280 gram, afkomstig van het centraal dierenlab Groningen. De dieren zijn gevoed met brokjes type RMH-B, van Hope farms in Woerden. De dieren hadden vrijelijk toegang tot brokjes en water tot de operatie.

Narcose werd geïnduceerd door een intraperitoneale injectie van 40 mg/kg pentobarbital. Tijdens de operatie werd de reactie op pijnprikkels regelmatig getest en zo nodig werd pentobarbital bijgespoten. Na de operatie werd additionele narcose gegeven door beademing met 70 % N<sub>2</sub>O. Zolang de narcose duurde werd de rectale temperatuur op 37 °C gehouden. Dit werd tijdens de operatie gedaan door de temperatuursinstelling van een verwarmingsdeken te variëren en tijdens de beademing door een verwarmingslamp hoger of lager te plaatsen.

### **2.2. Operatie**

De operatie bestond uit het implanteren van intracerebrale electrodes voor het afleiden van de impedantie, occlusie van de linker arteria carotis en tracheale intubatie. Bipolaire electrodes werden in het striatum geleid door deze en de kop van de rat in een stereotaxie-apparaat te klemmen. De coördinaten werden bepaald aan de hand van de atlas van Paxinos en Watson (1982). De huid op de schedel werd in de lengterichting doorgesneden en de schedel werd vrijgeprepareerd door verplaatsen van periostvlies. Het bregmapunt werd bepaald en de electrodes werden 0,5 mm frontaal van het bregmapunt en 2,5 mm lateraal van de mediaanlijn gepositioneerd. Op deze plaats werd de schedel doorboord, maar de dura mater werd intact gehouden. De dura mater werd later met een gekromde injectienaald opgetild en verwijderd. De electrodes werden 6 mm diep ingebracht en erna aan de schedel vastgemaakt met polyacrylaat. Aan het einde van het experiment werden de hersenen verwijderd en werd gecontroleerd of de electrodes in het striatum gepositioneerd waren.

Na een incisie in de hals links van de mediaanlijn, werd de splitsing van de arteria carotis communis in de carotis interna en externa opgezocht. De carotis communis werd distaal geligeerd en proximaal gecannuleerd. De cannule werd aan de carotis bevestigd door een

gedeelte van het vat met hechtdraad te omklemmen. Daarna werd  $\pm 0,1$  ml van een heparine oplossing (50 E/ml) ingespoten om lokale stolling te voorkomen. De cannule werd later gebruikt voor de afname van bloed voor de bepaling van bloedgasen  $O_2$ ,  $CO_2$  en de pH en voor de bepaling van de gemiddelde arteriële bloeddruk (ABD) met behulp van de druk/spanning omvormer KP 100 van Philips.

Er is een variabele verbinding tussen de linker en rechter arteria carotis interna via de carotis externae, die de weke delen van het hoofd verzorgen. Om deze collaterale circulatie te blokkeren, werd de linker arteria carotis interna geligeerd. Een vena jugularis werd gecannuleerd om eventuele intraveneuze infusie en bloedafname mogelijk te maken. De cannule werd  $\pm 3$  cm opgeschoven en aldus in het rechter atrium gelegd. Om de cannule open te houden was deze gevuld met een heparine oplossing van 50 E/ml. In de meeste experimenten werd de trachea vrijgeprepareerd, werd er een hechtdraad omheen gelegd en een tube ingeschoven en gefixeerd door het aanhalen van de hechtdraad. In de rest van de experimenten werd endotracheaal geïntubeerd, om de effecten van (24 uren) overleving te onderzoeken. In dit geval werd de tube er, voor het bijkomen uit de narcose, uitgehaald.

### **2.3. Het repetitieve model**

Deze paragraaf beschrijft de gebruikte methode om hersenschade te veroorzaken. Het is de bedoeling, dat alleen de hersenhelft aan de zijde van de carotis occlusie beschadigd raakt (ipsilateraal). Daartoe werd herhaaldelijk het zuurstof aanbod verlaagd (beademing met 10 % zuurstof). Daardoor ontstond hypoxie en relatieve ischemie in de ipsilaterale hemisfeer.

De elektrische weerstand (impedantie) tussen de elektroden van het ipsilaterale striatum werd continu gemeten. Als regel werd zoveel keren hypoxie-ischemie toegediend, totdat er irreversibele impedantiestijging optrad.

#### **2.3.1. De beademing**

Na de operatie werden de ratten beademd met 70 %  $N_2O$  en 30 %  $O_2$  met een constant volume aanbod (respirator Loosco Mk2, Amsterdam). Met deze beademingsmethode vloeien de gasen continu langs de tube (1 l/min), waarbij de druk ter plekke van de trachea tube varieert van  $\pm 1,2$  kPa naar 0 kPa. Bij de positieve druk treedt gas de longen in, en erna stroomt gas er spontaan uit. Na een stabilisatie periode van 15 minuten werd het zuurstof gehalte van het gasmengsel gedurende 10 minuten verlaagd naar 10 % (hypoxie) bij een gasstroom van 0,65 l/min. Daarna werd gedurende 10 minuten het

normale gasmengsel (van 30 % O<sub>2</sub>) weer toegevoegd (normoxie). Eén hypoxie en normoxie periode duurt dus 20 minuten. Er werden 2 tot 7 van deze episodes toegediend. Zie verder de methoden-secties van de desbetreffende hoofdstukken.

### *2.3.2. De impedantie meting*

Gedurende de beademing werd van beide striata de impedantie afgeleid. Dit geschiedt door in elk striatum een geringe wisselstroom (20  $\mu$ A) op de gepaarde electrode aan te bieden (20 kHz, sinus). Bij deze frequentie treedt geen fase verschuiving op tussen stroom en spanning (Aladjalova, 1964). Daarom kon de impedantie worden berekend uit de verhouding tussen wisselspanning (variabel) en stroom (constant = 20  $\mu$ A).  $R = V/I$ .

De hoogte van de impedantie tussen de beide polen van de electrode wordt bepaald door de aard van het biologische medium ertussen. Het striatum bestaat uit 80 % cellen en 20 % extracellulaire vloeistof (Van Harreveld, 1972). Elke cel vormt een door een celmembraan (isolator) afgeschermd compartiment. De geleiding door de cellen is erg slecht (< 0,3 %). De extracellulaire ruimte is een aaneengesloten compartiment, gevuld met electrolyten en water, en geleidt erg goed (> 99,7 %). Hierdoor bepaalt alleen de grootte van de extracellulaire ruimte de mate van de elektrische geleiding (Aladjalova, 1964).

Door ischemie daalt het extracellulaire volume (ECV). De impedantie verandert omgekeerd evenredig met het ECV en stijgt dus (Van Harreveld, 1972). In dit proefschrift wordt met behulp van de impedantie de relatieve verandering van het ECV berekend, met 100 % als begin waarde. Het ECV daalt ongeveer tot 50 % van de beginwaarde, waarbij de impedantie verdubbelt.

## **2.4. Histologische bepaling van de celschade**

Celschade werd bepaald met een methode waarbij zilver neerslaat in beschadigde neuronen. Daartoe werden de ratten onder diepe narcose gebracht met pentobarbital en door het hart geperfundeerd met fysiologisch zout (0,9 % NaCl) gedurende 1 minuut, gevolgd door 400 ml van een 4 % paraformaldehyde oplossing in 0.1 M fosfaatbuffer van pH 7,4 (fixatief). Na 1 uur werden de hersenen verwijderd en in het fixatief bewaard bij 4°C gedurende 1-5 dagen en daarna in fixatief met 30 % sucrose gedurende 2 dagen. Van de gehele hersenen werden 40  $\mu$ m dikke coupes gesneden, in een vries microtoom, bij -20°C, en deze werden vervolgens maximaal 6 maanden bewaard in fixatief bij 4°C. De coupes werden gekleurd volgens de modificatie (Nadler en Evenson, 1983) van de zilverimpregnatiekleuring van Gallyas e.a. (1980). In deze procedure worden alle coupes in een rek geplaatst en wordt het rek in opeenvolgende oplossingen gedompeld.

De coupes werden achtereenvolgens gewassen in aqua dest, voorbehandeld met alkalische ammoniumnitraat, geïmpregneerd met 0,5 % zilvernitraat in alkalische ammoniumnitraat, behandeld met ammoniumnitraat en natriumcarbonaat in waterige alcoholoplossing en uiteindelijk ontwikkeld. Om de aspecifieke impregnatie te minimaliseren is de concentratie van zilvernitraat in het impregnatiebad laag gehouden. De kleuringsprocedure duurde ongeveer 45 min. De coupes werden opgeslept op objectglasjes, overnacht gedroogd, behandeld met 0,5 % azijnzuur, gedehydreerd in een alcoholreeks, opeenvolgend geplaatst in twee bakjes butanol en drie bakjes met xylol. Dekglasjes werden opgebracht met mallinol. Als controle werden aanliggende coupes gekleurd met hematoxyline eosine.

## **2.5. Kwantificering van de celschade**

Voor het objectief bepalen van de ernst van de neuronale schade werd elke coupe gefotografeerd en werd de zwarting van beschadigde gebieden op het negatief bepaald met densitometrie. De variatie van zilveropname binnen een procedure is zeer gering, omdat alle coupes worden gekleurd in één rek en dus dezelfde behandeling krijgen. Daarom is er één procedure gedaan voor de kleuring van alle coupes die werden doorsneden op het coronale vlak 0.2 mm voor het bregma (t.h.v. striatum) en één kleuring voor het coronale vlak van 3,3 mm en 5,8 mm achter het bregma (resp. thalamus en substantia nigra).

Na de kleuring werden alle coupes gefotografeerd onder dezelfde omstandigheden. Er werden een Wild microscoop type M5A uit Heerbrugg, Duitsland, met een originele camera adapter en een Nikon FM2 camera gebruikt. Het contrast tussen specifieke zilveropname (schade, zwart) en aspecifieke opname (geen schade, bruin) werd verhoogd door de coupes met donkerveld te belichten (Holzgraefe en Wolff, 1977). Alle coupes binnen één coronaal vlak werden bij dezelfde lineaire vergroting (2,46 x), dezelfde lichtintensiteit (transformator op 10 V), dezelfde belichtingstijd (20 sec bij het vlak + 0,2 mm en 30 sec bij het vlak -3,3 mm en -5,8 mm van het bregma) en hetzelfde diafragma (stand 3) gefotografeerd. Technical Pan film van Kodak werd zo lang ontwikkeld, dat de achtergrondimpregnatie 1 densiteitseenheid boven de sluier zat en de specifieke impregnatie maximaal 2,5 eenheden boven de sluier. De densiteitstoename bleek recht evenredig met de toename van lichtintensiteit bij ontwikkeling gedurende 6 min in HC-110 van Kodak in verdunning B bij 20 °C (zie ook de contrastindexcurves in de produktinformatie over Technical Pan van Kodak, Odijk). De zwarting van de negatieven is gemeten met een transmissie densitometer van Gretag type D33 uit Regensdorf, Zwitserland. De meetopening was 1

mm en dit komt overeen met een meetdiameter van 0,41 mm in de originele coupe.

## 2.6. Statistiek

In dit proefschrift wordt de Mann-Whitney U test gebruikt om verschillen tussen groepen data te bepalen. Deze non-parametrische toets is gebruikt, omdat er meestal niet van een normale verdeling kan worden uitgegaan. Bovendien geldt voor alle data, dat de groepen niet groot genoeg zijn om een normale verdeling van het gemiddelde te krijgen en vervolgens het verschil in het gemiddelde parametrisch te toetsen. Er werd bij de Mann-Whitney U test een significantie van  $p < 0,05$  geëist voor het bepalen van een statistisch verschil.



### **3. Het effect van repetitieve hypoxie op de impedantie, het extracellulair volume en electrolytverschuivingen**

#### **3.1. Inleiding**

Tijdens ischemie treedt er netto een verplaatsing op van ionen en water van de extracellulaire- naar de intracellulaire ruimte. Bij het herstellen van de circulatie zijn deze verschuivingen meestal omkeerbaar. In sommige omstandigheden zijn de celzwellingen en de hieraan gerelateerde ion-verschuiving (Branston e.a., 1978) en impedantiestijging (Hossmann, 1971; DeBoer e.a., 1989) onomkeerbaar. In dit geval treedt mogelijk acute celdood op van gliacellen en neuronen. Het vinden van irreversibele impedantieverandering in de recirculatie periode is mogelijk een zeer snelle manier om celdood aan te tonen.

Voor de huidige experimenten is het in hoofdstuk 2.3 beschreven repetitieve model gebruikt. Er werd onderzocht in hoeverre met dit model op een reproduceerbare wijze irreversibele impedantieverandering (IV) in het striatum te induceren is. Er werden tussen de 2 en 5 periodes hypoxie-ischemie toegediend, afgewisseld met evenveel periodes normoxie-recirculatie.

In het vervolg van dit hoofdstuk wordt beschreven na welk aantal hypoxie periodes de impedantie irreversibel steeg. Daarnaast werd gekeken naar het gevolg van irreversibele IV op de langere termijn. Na 3 uur recirculatie werd de schade aan de bloed-hersen barrière (BHB) bepaald en werd de verandering van de verhouding tussen  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  in verscheidene hersenstructuren gemeten. Een verhoogde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio geeft aan dat hersenweefsel zeer ernstig is beschadigd.

#### **3.2. Materialen en methoden**

Er werden twee experimentele groepen gevormd. De ene groep ratten onderging irreversibele IV van het striatum en de andere groep onderging reversibele IV. Van irreversibele IV werd gesproken wanneer de impedantie gedurende normoxie-recirculatie spontaan ging stijgen, waarbij de impedantie minimaal 1,3 keer de beginwaarde moest worden. Een reversibel verloop betreft de overige gevallen, waarbij de impedantie normaliseerde gedurende permanente recirculatie.

Gedurende repetitieve hypoxie werd 1 ml arterieel bloed afgenomen voor de bepaling van bloedgassen. De pH,  $\text{pO}_2$  en zuurstofsaturatie werden minimaal in duplo bepaald bij kamertemperatuur met de Acid-base laboratory ABL 330 van Radiometer, Copenhagen.



Binnen 10 minuten na repetitieve hypoxie werd 0,6 ml van een 2 % Evans Blauw oplossing in de staartvene gespoten. Daarna werden de ratten ontkoppeld van de beademing en impedantiemeter en kwamen bij.

Na 3 uur werd opnieuw pentobarbitalnarcose gegeven, werden de impedantieëlectrodes weer aangesloten en werd hartstilstand opgewekt door 0,5 ml van een oplossing met 300 mg  $Mg/Cl_2$  in de staartvene te spuiten. De hersenen werden na 20 minuten uit de schedel gehaald. In één groep ratten werd de Evans Blauw kleuring bepaald. Evans blauw bindt aan albumine in het bloed en dit complex passeert alleen de BHB als deze beschadigd is. In een andere groep werden weefselstukjes genomen uit de cerebellaire cortex, frontale cortex, striatum en hippocampus. Het weefsel werd direct op droog ijs geplaatst en bewaard bij  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Later werd het gehalte van  $Na^+$  en  $K^+$  bepaald door vlam emissie spectroscopie (zie Korf en Postema, 1984). Zie verder hoofdstuk 2 voor de beschrijving van de operatie, bloeddrukmeting, impedantiemeting, het repetitieve model en de statistiek.

### 3.3. Resultaten en commentaar

In tabel 3.1 zijn de gemiddelde arteriële bloeddruk (ABD), de pH,  $pCO_2$ ,  $pO_2$  en  $O_2$  saturatie in arterieel bloed vermeld. Er was geen significant verschil tussen de waarden van de groep met reversibele uitkomst enerzijds ( $n=5$ ) en irreversibele uitkomst anderzijds ( $n=5$ ). Daarom is het gemiddelde van beide groepen gezamenlijk berekend en getoond in tabel 1.

*Tabel 3.1. Fysiologische variabelen in het repetitieve model. De gemiddelde arteriële bloeddruk (ABD) en bloedgasen zijn uitgedrukt in de gebruikelijke eenheden. Gemiddelde en standaardafwijking van het gemiddelde zijn vermeld van telkens 10 waarnemingen.*

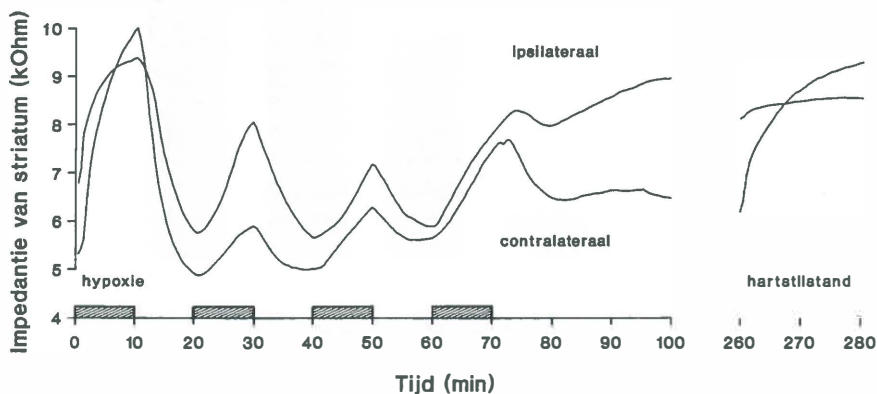
	post-operatief	normoxie	hypoxie	normoxie-recirculatie
ABD (mmHg)	122,7 $\pm$ 2,5	128,1 $\pm$ 2,3	50,9 $\pm$ 2,8	114,8 $\pm$ 3,9
pH	7,30 $\pm$ 0,02	7,22 $\pm$ 0,03	7,13 $\pm$ 0,01	7,24 $\pm$ 0,04
$pCO_2$ (kPa)	4,76 $\pm$ 0,20	5,96 $\pm$ 0,58	5,48 $\pm$ 0,39	4,18 $\pm$ 0,28
$pO_2$ (kPa)	13,95 $\pm$ 0,40	21,36 $\pm$ 1,00	4,56 $\pm$ 0,17	13,28 $\pm$ 0,50
Saturatie $O_2$ (%)	99,0 $\pm$ 0,1	99,5 $\pm$ 0,1	48,5 $\pm$ 3,4	98,9 $\pm$ 0,1

Vergeleken met postoperatieve normaalwaarden gingen de  $pO_2$  en  $pCO_2$  na beademing gering omhoog en de pH iets omlaag. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het relatief hogere zuurstof gehalte van 30 % in de beademingslucht (gebruikelijk in deze experimenten).

Tijdens hypoxie daalden de arteriële  $pO_2$ , de zuurstof saturatie en de bloeddruk dramatisch. Deze combinatie van factoren veroorzaakt in het huidige diemodel een daling van de doorbloeding (CBF) in één hersenhelft (vergelijk Salford en Siesjö, 1974 met Gardiner e.a., 1982). De bloeddruk daalde in onze experimenten nog sterker dan in die van Gardiner. Daaruit volgt, dat in het repetitieve model de mate van (incomplete) ischemie ernstiger is.

Tijdens normoxie-recirculatie normaliseerden de fysiologische variabelen niet geheel. Mogelijk komt dit door een verhoogd gebruik van zuurstof en andere voedingsstoffen in de hersenen en elders in het lichaam.

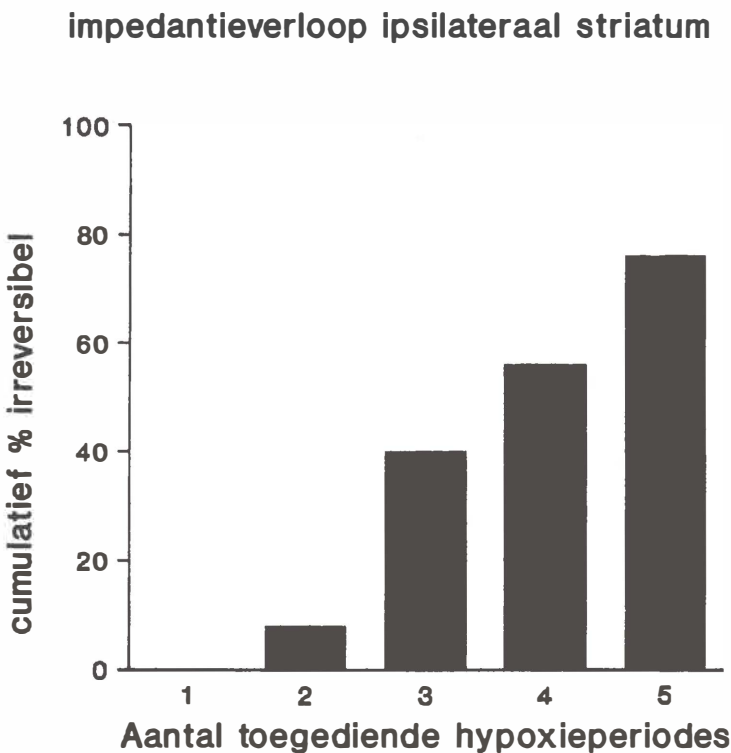
In figuur 3.1 wordt het verloop van de impedantie in het striatum ipsilateraal en contralateraal van de carotis occlusie getoond. Tijdens hypoxie-ischemie ging de impedantie beiderzijds omhoog en daalde tijdens normoxie-recirculatie. Dit herhaalde zich totdat de ipsilaterale impedantie tijdens recirculatie na een initieel herstel spontaan ging stijgen (irreversibele IV). Contralateraal trad een langzame daling op (reversibele IV). Toen na 3 uur overleving hartstilstand werd geïnduceerd (volledige ischemie), bleek dat aan de



*Figuur 3.1. Verloop van de impedantie gedurende repetitieve hypoxie-ischemie. Ipsilateraal is de arteria carotis geoccludeerd. Gedurende recirculatie herstelt de impedantie niet aan de ipsilaterale zijde maar wel aan de contralaterale zijde. Tijdens hartstilstand vertoont alleen de contralaterale zijde de normale impedantiestijging.*

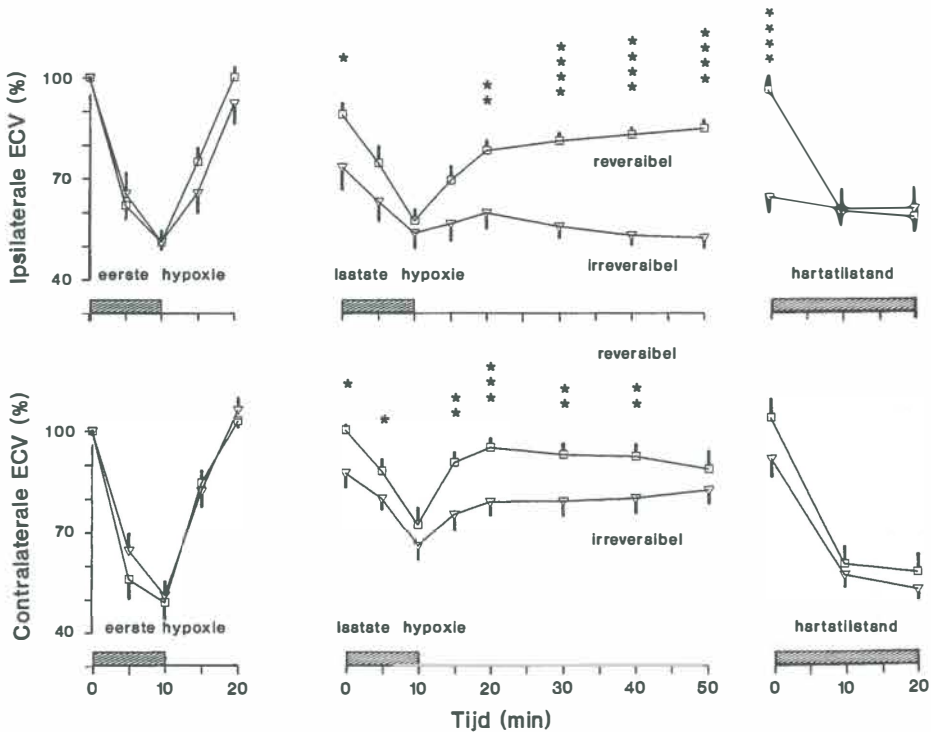
ipsilaterale kant de impedantie nauwelijks verder steeg, terwijl contralateraal de normale ischemie respons optrad.

In alle experimenten kon er binnen 20 minuten recirculatieuur duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen irreversibel en reversibel impedantieverloop. In totaal waren er 16 experimenten met irreversibel en 9 experimenten met reversibel verloop. In figuur 3.2 staat het cumulatieve risico dat irreversibele IV optrad bij de opeenvolgende hypoxie periodes.



*Figuur 3.2. Effect van repetitieve hypoxie op het impedantieverloop. De verhouding tussen het aantal experimenten met irreversibel verloop en het totaal aantal experimenten is uitgezet voor elke opeenvolgende hypoxie periode. Irreversibiliteit nam progressief toe tijdens de derde en volgende periodes.*

Na 1 hypoxie periode trad geen irreversibele IV op. Na 2 periodes in 1 van de 10 gevallen en na 3 of meer periodes elke keer in ongeveer een kwart van de gevallen. Na 5 periodes onderging in totaal 76 % van de dieren irreversibele IV in het ipsilaterale striatum. Dit percentage is hoog vergeleken met de 38 % na 2 uur reversibele focale ischemie (Branston e.a., 1978), de 20 % na 30 min hypoxie-ischemie (DeBoer e.a., 1989) en de 0 % na 1,5 uur incomplete ischemie (Hossmann, 1971).



*Figuur 3.3. Gemiddelde extracellulaire volume (ECV) tijdens repetitieve hypoxie. Er is een groep met reversibele IV en een groep met irreversibele IV gevormd. Drie uur na repetitieve hypoxie werd hartstilstand gegeven. De verschillen tussen deze groepen zijn significant indien aangegeven: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .*

In figuur 3.3 wordt het verloop van het extracellulaire volume (ECV) vergeleken tussen de experimenten met reversibel en irreversibel verloop. Het ECV was bij het begin van elk experiment gesteld op 100 %. De veranderingen hierna zijn bepaald met de impedantie, die omgekeerd evenredig met het ECV verandert.

Het ECV in het contralaterale striatum verschilde tijdelijk significant tussen de beide

groepen. Dit betekent, dat bij het ontstaan van ipsilaterale irreversibiliteit er contralateraal ook een verslechtering van het ECV optrad. Na 40 minuten recirculatie trad er contralateraal wel maar ipsilateraal geen herstel op (zie figuur 3).

Het ipsilaterale en contralaterale ECV was vooraf aan de laatste hypoxie lager, wanneer zich hierna irreversibele IV ontwikkelde. Er was dus enige progressieve celzwellling al voordat er duidelijk irreversibele IV optreedt. Opvallend is dat irreversibiliteit zich in beide striata aldus vroeg aanmeldde.

Na 3 uur recirculatie was het ipsilaterale ECV nog steeds sterk significant lager in de dieren met irreversibiliteit versus reversibiliteit. Het contralaterale ECV verschilde niet significant tussen beide groepen. Om te bepalen in hoeverre het ECV zich op langere termijn herstelde, werd een gepaarde Wilcoxon test gedaan tussen de begin waarde van het ECV en de waarde na 3 uur recirculatie. Bij de dieren met reversibel verloop kwam het ECV terug op begin niveau (geen significant verschil). Bij de dieren met irreversibel verloop was het ECV (alleen ipsilateraal) gedaald na 3 uur ( $p < 0,0001$ ).

*Tabel 3.2. Verhouding tussen  $Na^+$  en  $K^+$  in hersenweefsel 3 uur na repetitieve hypoxie. Eén groep vertoonde irreversibele IV, in de andere groep was dit omkeerbaar. De verschillen tussen de beide groepen zijn significant indien aangegeven met a  $p < 0,02$  en b  $p < 0,0002$ .*

	REVERSIBEL (n=9)		IRREVERSIBEL (n=16)	
	ipsilateraal	contralateraal	ipsilateraal	contralateraal
Striatum	0,43 ± 0,03	0,36 ± 0,01	1,14 ± 0,18 b	0,44 ± 0,05
Cortex	0,47 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,99 ± 0,16 a	0,52 ± 0,08
Hippocampus	0,53 ± 0,07	0,39 ± 0,02	0,66 ± 0,07	0,37 ± 0,02
Cerebellum	0,53 ± 0,07		0,46 ± 0,06	

Tabel 3.2 toont de verhouding van  $Na^+$  en  $K^+$  gehalte in hersenstructuren. In het ipsilaterale striatum en in de frontale cortex werd een significant hogere  $Na^+/K^+$  ratio gevonden na irreversibele IV versus reversibele controle. Irreversibele IV is dus een voorbode voor de opname van  $Na^+$  en verlies van  $K^+$  in striataal en corticaal weefsel. Bij focale ischemie treedt de verhoging van  $Na/K$  ratio alleen op in gebieden die zich in dit model tot infarct ontwikkelen (Schuier en Hossmann, 1980). Dit is aannemelijk, omdat m.n. gliacellen verantwoordelijk zijn voor normalisering van ion-gradiënten (Hertz, 1981), en gliacellen uitsluitend na infarcering te gronde gaan. Irreversibele IV is waarschijnlijk een voorbode van een infarct.

Omdat tijdens ischemie geen herverdeling van ionen via het bloed kan plaatsvinden, kunnen de weefselconcentraties van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  niet veranderen. Dit kan pas gebeuren nadat de bloedtoevoer hersteld is en er uitwisseling van ionen via de BHB optreedt. Omdat de weefselconcentraties van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  veranderen, treedt er klaarblijkelijk recirculatie op in het repetitieve model.

In 5 dieren met reversibel en 5 dieren met irreversibel verloop gaf Evans Blauw geen blauwkleuring van enig hersengebied. De BHB was blijkbaar nog niet beschadigd. Transport van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  was dus geschied over een intacte BHB. Dit komt overeen met resultaten van Betz e.a. uit 1990, dat verhoging van intracerebraal  $\text{Na}^+$  niet wordt veroorzaakt door een verhoogde permeabiliteit van de BHB, maar doordat de afvoer van  $\text{Na}^+$  naar het bloed is verminderd.  $\text{Na}^+$ , dat de BHB passeert, komt waarschijnlijk intracellulair terecht, waar het niet weg kan, omdat de cellen irreversibel beschadigd zijn. Evenzo verlaat  $\text{K}^+$  de cel ongeremd.

### 3.4. Conclusies

Het is mogelijk om op een reproduceerbare wijze irreversibele IV te veroorzaken door ratten aan repetitieve hypoxie-ischemie te onderwerpen. Er moeten hiervoor minimaal 2 episodes gegeven worden. Door nog meer te geven kan in een meerderheid van de dieren irreversibele IV worden opgewekt.

Irreversibele IV kan al na 20 minuten recirculatie worden bepaald, blijft in ieder geval 3 uur aanwezig en veroorzaakt in deze periode netto verplaatsing van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  over de BHB. De BHB is hierbij intact. De gevonden netto opname van  $\text{Na}^+$  en het verlies van  $\text{K}^+$  in weefsel wijst op irreversibele beschadiging van een meerderheid van de cellen in het striatum. Er zijn blijkbaar te weinig (glia) cellen intact om de iongradiënten te kunnen normaliseren. Mogelijk is irreversibele IV een voorbode van een infarct.



## 4. De relatie tussen het impedantieverloop en celschade

### 4.1. Inleiding

In het vorige hoofdstuk is gebleken, dat na repetitieve hypoxie vaak irreversibele impedantieverandering (IV) optrad in het striatum. Dit ging samen met langdurige verstoring van celvolume en gradiënten van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  in het striatum. Het is onbekend of er na irreversibele IV (i.t.t. reversibele IV) ernstige celschade of een infarct optreedt. Indien dit het geval is, kan de impedantie gebruikt worden om zeer vroeg een infarct aan te tonen.

In het huidige hoofdstuk wordt onderzocht in welke mate er celschade ontstaat na irreversibele IV. Ter vergelijking wordt de celschade na reversibele IV bekeken. Na hypoxie worden cellen beschadigd in het striatum, de cortex, de thalamus en de hippocampus (Salford e.a., 1973). Daarom werd onderzocht of het impedantieverloop (in het striatum aan de zijde van de carotis occlusie) een voorspelling kan doen over de ernst van de schade in al deze gebieden.

Een belangrijk methodologisch probleem is het objectief meten van de ernst van hersenschade. Met een conventionele Hematoxyline-eosine (H-E) kleuring is ischemische schade aan de kern (pyknose) moeilijk te onderkennen. Bovendien treden de veranderingen pas consistent op na langere recirculatie duur (5-7 dagen). Bij de zilverimpregnatie kleuring (Gallyas e.a., 1980) is duidelijk onderscheid te maken tussen beschadigde neuronen (diep zwart) en intacte neuronen (licht bruin). Bovendien is de methode gevoelig, laat het zeer snel schade zien (binnen uren) en leent het zich uitstekend voor het objectief kwantificeren van de schade. Om deze redenen is in dit hoofdstuk deze zilver kleuring gebruikt. Toch is er ook een H-E kleuring gedaan om eventuele oedematische veranderingen te laten zien.

### 4.2. Materialen en methoden

Eenzijds werden er 2 hypoxie periodes toegediend om een reversibele IV in het striatum te induceren. Anderzijds kreeg de "irreversibele groep" zoveel (3 of meer) hypoxieperiodes, dat irreversibele IV optrad.

Na 4 of 24 uur overleving kregen de dieren een lethale pentobarbital injectie en werden de hersenen geperfundeed met een 4 % paraformaldehyde oplossing. Coupes van 40  $\mu\text{m}$  werden gesneden in het vriesmicrotroom en werden gekleurd volgens de methode van Nadler en Evenson (1983). De helderheid van de coupes werd op zwart-wit film vastgelegd en daarna werd de zwarting van de negatieven gemeten met een densitometer. De



zwarting van hersengebieden na irreversibele IV werd vergeleken met gebieden na reversibele IV.

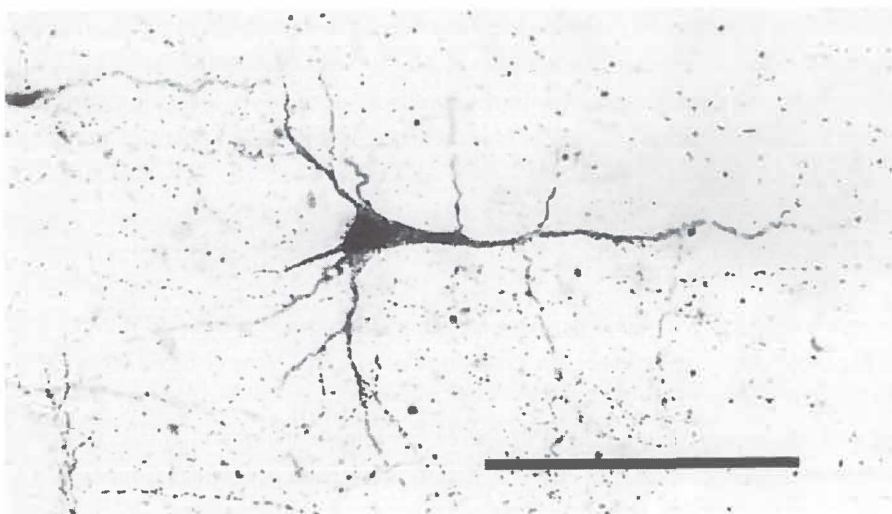
De gebieden aan de dezelfde kant van de carotisocclusie (ipsilateraal) en aan de andere zijde (contralateraal) werden onderzocht op zwarting. Aanliggende coupes werden gekleurd met hematoxyline-eosine.

Zie verder hoofdstuk 2 voor uitleg over de operatie, het repetitieve model, de impedantiemeting en histologische technieken.

## 4.3. Resultaten

### 4.3.1. Zilverimpregnatie na 4 uur recirculatie

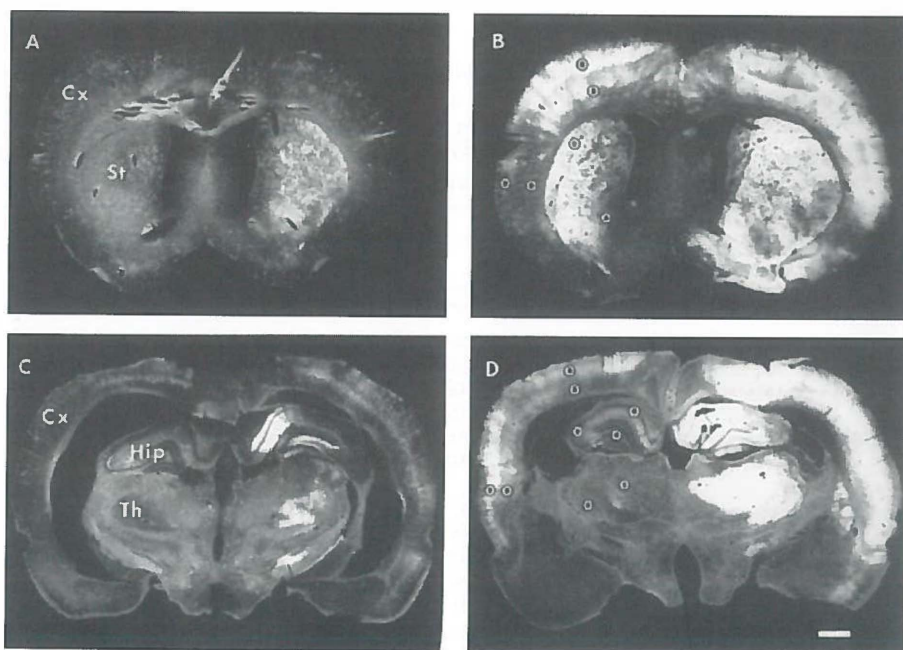
In deze sectie zullen de resultaten van de zilverimpregnatie kleuring na 4 uur recirculatie worden besproken. Eerst wordt een voorbeeld getoond van een beschadigd neuron. Vervolgens wordt een overzichtopname van dwarsdoorsnedes van de hersenen getoond. Daarna wordt besproken in welke mate er zilveropname (schade) ontstaat na irreversibele IV in vergelijking met reversibele IV. Daartoe wordt in een tabel de zilveropname van hersengebieden in getallen uitgedrukt, en is op microscopische opnames te zien welke neuronen beschadigd zijn en welke intact zijn.



*Figuur 4.1. Een grote pyramidecel in laag 5 van de frontale cortex ipsilateraal van de carotis occlusie, 4 uur na reversibele IV (2 keer hypoxie). Zilverimpregnatiekleuring. Balk = 100  $\mu$ m.*

In figuur 4.1. is een voorbeeld te zien van een beschadigd neuron. Het cellichaam kan goed worden onderscheiden van de licht gekleurde achtergrond. Daarnaast zijn de uitlopers van dit neuron goed te vervolgen. De zwarte stippen zijn waarschijnlijk dwars doorsneden uitlopers van andere neuronen.

Figuur 4.2. toont een overzicht van de zilverimpregnatie na 4 uur recirculatie. Vergelijk de linker (reversibele IV) en de rechter (irreversibele IV) deelfiguren. Na *reversibele IV* ontstond er zeer geringe zilveropname in de contralaterale hemisfeer en geringe zilveropname in de hemisfeer ipsilateraal van de carotis occlusie. Na *irreversibele IV* was in



Figuur 4.2. Zilverimpregnatie na 4 uur recirculatie (donkerveldopname). Des te helderder de tint des te meer zilver opgenomen is. Let op de hogere helderheid in de rechter deelfiguren. A: frontale doorsnede, reversibele IV. B: frontale doorsnede, irreversibele IV. C: dorsale doorsnede, reversibele IV. D: dorsale doorsnede, irreversibele IV. In de hersenhelft contralateraal van de carotisocclusie zijn teksten en symbolen geplaatst, die bovendien gelden voor de andere zijde: o = gebied dat is doorgemeten (zie tabellen), Cx = cortex, St = striatum, Hip = Hippocampus, Th = Thalamus. Balk = 1 mm.

de contralaterale hersenhelft redelijk veel zilver opgenomen, en ipsilateraal zeer veel. De cortex, het striatum, de hippocampus en de thalamus namen alle zeer veel zilver op.

In tabel 4.1. wordt de zilveropname getallen uitgedrukt. Het effect van reversibele IV (5 experimenten) en irreversibele IV (4 experimenten) is statistisch vergeleken (Mann-Whitney U test).

Na irreversibele IV is de gemiddelde zilveropname in de ipsilaterale zijde zeer hoog in het striatum (1,81-2,12), in de cortex (1,51-1,91), in de thalamus (1,90-2,03) en de substantia nigra (2,03). Het verschil met reversibele IV is in al deze gebieden behalve de substantia nigra significant ( $p < 0,05$ ). De schade in de ipsilaterale hemisfeer (gehele cortex, striatum en thalamus) is dus sterk afhankelijk van het impedantieverloop in het ipsilaterale striatum.

*Tabel 4.1. Zilverimpregnatie na 4 uur recirculatie. De zilveropname is op fotografisch negatief gemeten. Zie figuur 4.2. voor de ligging van de gebieden. A: sagittale doorsnede 0,2 mm frontaal van bregmapunt. B: sagittale doorsnede 3,3 mm caudaal, en C 5,8 mm caudaal van bregma. De gemiddelde waardes en SEM zijn aangegeven. Er is een significant verschil in impregnatie tussen de groep met reversibele en irreversibele IV indien aangegeven met a  $p < 0,05$  of b  $p < 0,02$ .*

				REVERSIBEL (n=5)		IRREVERSIBEL (n=4)	
				contralateraal	ipsilateraal	contralateraal	ipsilateraal
A	Cortex	mediaal	opp.	1,13 ± 0,14	1,16 ± 0,18	1,59 ± 0,26	1,73 ± 0,17 b
			diep	1,07 ± 0,08	1,13 ± 0,11	1,44 ± 0,28	1,78 ± 0,17 a
		lateraal	opp.	1,16 ± 0,10	1,12 ± 0,11	1,26 ± 0,19	1,85 ± 0,11 b
			diep	1,14 ± 0,06	1,13 ± 0,05	1,15 ± 0,19	1,60 ± 0,15 a
	Striatum	dorsolateraal	1,26 ± 0,07	1,51 ± 0,07	1,45 ± 0,17	1,81 ± 0,15 a	
		ventromediaal	1,33 ± 0,05	1,34 ± 0,11	1,29 ± 0,10	2,12 ± 0,07 b	
B	Cortex	mediaal	opp.	0,98 ± 0,05	0,97 ± 0,06	1,22 ± 0,27	1,91 ± 0,06 a
			diep	0,91 ± 0,04	0,94 ± 0,04	0,92 ± 0,19	1,74 ± 0,15 a
		lateraal	opp.	0,85 ± 0,04	0,87 ± 0,06	1,15 ± 0,24	1,82 ± 0,10 a
			diep	0,82 ± 0,06	0,84 ± 0,08	0,96 ± 0,15	1,51 ± 0,26 a
	Thalamus	lateraal	1,17 ± 0,03	1,34 ± 0,12	1,07 ± 0,11	1,90 ± 0,11 a	
		mediaal	1,11 ± 0,06	1,19 ± 0,05	1,06 ± 0,12	2,03 ± 0,15 a	
	Hippocampus	CA1	1,07 ± 0,06	1,16 ± 0,17	0,90 ± 0,16	1,76 ± 0,21	
		CA2-3	1,05 ± 0,08	0,97 ± 0,03	0,97 ± 0,12	1,20 ± 0,21	
		gyrus dentatus-CA4		0,98 ± 0,04	1,24 ± 0,12	0,95 ± 0,12	1,55 ± 0,22
C	Subst. Nigra reticulata			1,37 ± 0,06	1,68 ± 0,20	1,12 ± 0,14	2,03 ± 0,04

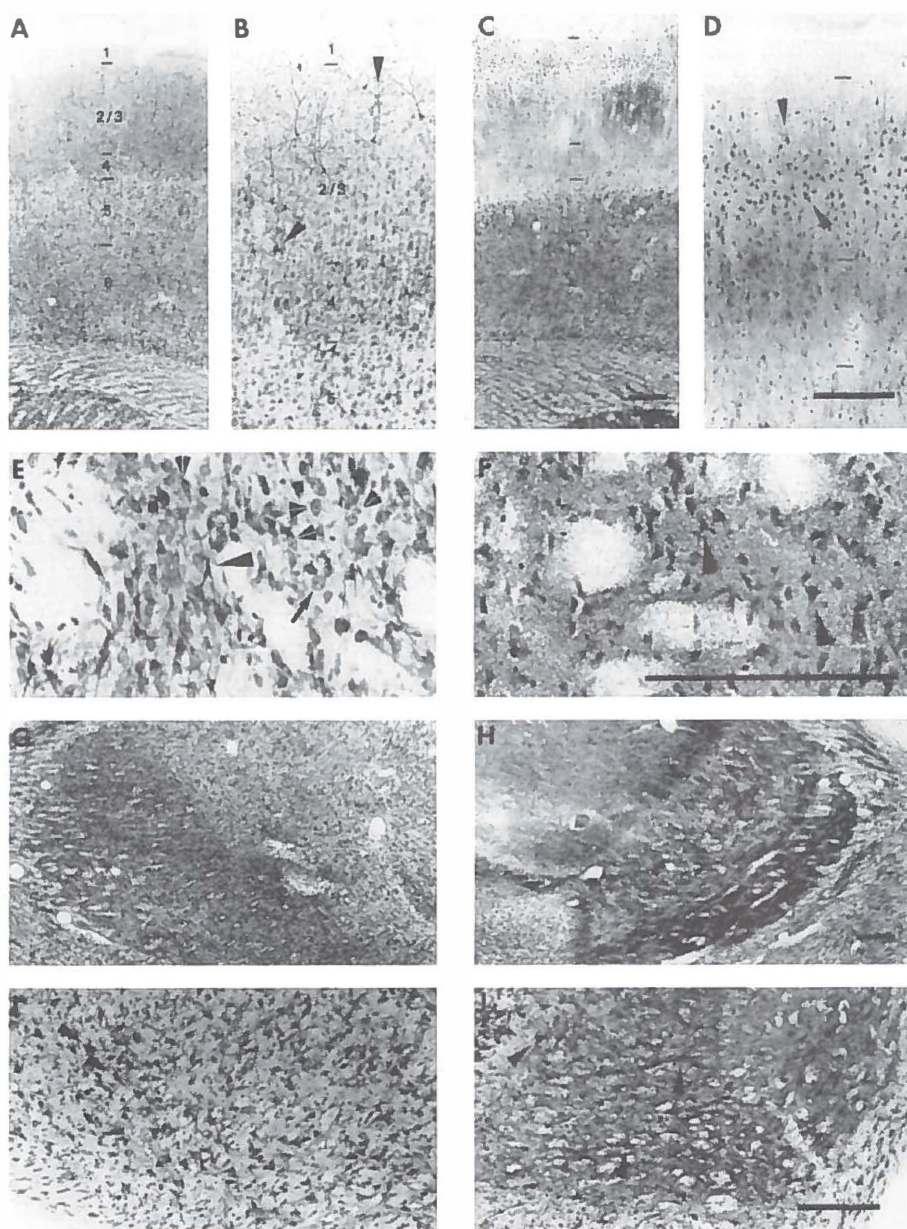
In de contralaterale hemisfeer normaliseerde de impedantie volledig na irreversibele IV ipsilateraal (zie ook hoofdstuk 3). Desondanks werd er in specifieke gebieden in de contralaterale hemisfeer zilver opgenomen (zie tabel 4.1): De gemiddelde opname was relatief hoog in de oppervlakkige- versus diepe cortex (resp. 1,59 en 1,44; 1,26 en 1,15; 1,22 en 0,92; 1,15 en 0,96) in de mediale- versus laterale cortex (resp. 1,59 en 1,26; 1,44 en 1,15; 1,22 en 1,15), frontale versus dorsale cortex (resp. 1,59 en 1,22; 1,44 en 0,92; 1,26 en 1,15; 1,15 en 0,96) en dorsolateraal- versus ventromediaal striatum (resp. 1,45 en 1,29). Na reversibele IV was in het ipsilaterale striatum (1,51 versus 1,34) en thalamus (1,34 versus 1,19) de zilveropname in de laterale gedeeltes weer hoger dan mediaal. Na reversibele IV werd dus schade aangetroffen in specifieke gebieden. Deze gebieden zijn blijkbaar zeer gevoelig voor ischemische schade.

In figuur 4.3 zijn microscopische opnames getoond van coupes behandeld met zilver, 4 uur na *irreversibele* IV van het ipsilaterale striatum. Na irreversibele IV is er enige schade van neuronen in de contralaterale hemisfeer. Er zijn beschadigde neuronen te zien in lagen 2 en 3 van de cortex, lateraal striatum, laterale thalamus en substantia nigra.

In de ipsilaterale hemisfeer zijn praktisch alle neuronen beschadigd in de frontale cortex, het striatum, de ventrobasale thalamuskernen en de substantia nigra. Er is in deze structuren bovendien zeer veel degenerend materiaal tussen de cellen te zien. Dit zijn waarschijnlijk beschadigde eindplaatjes (Heimer en Peters, 1968). Waarschijnlijk zijn vele zo niet alle neuronale eindplaatjes beschadigd.

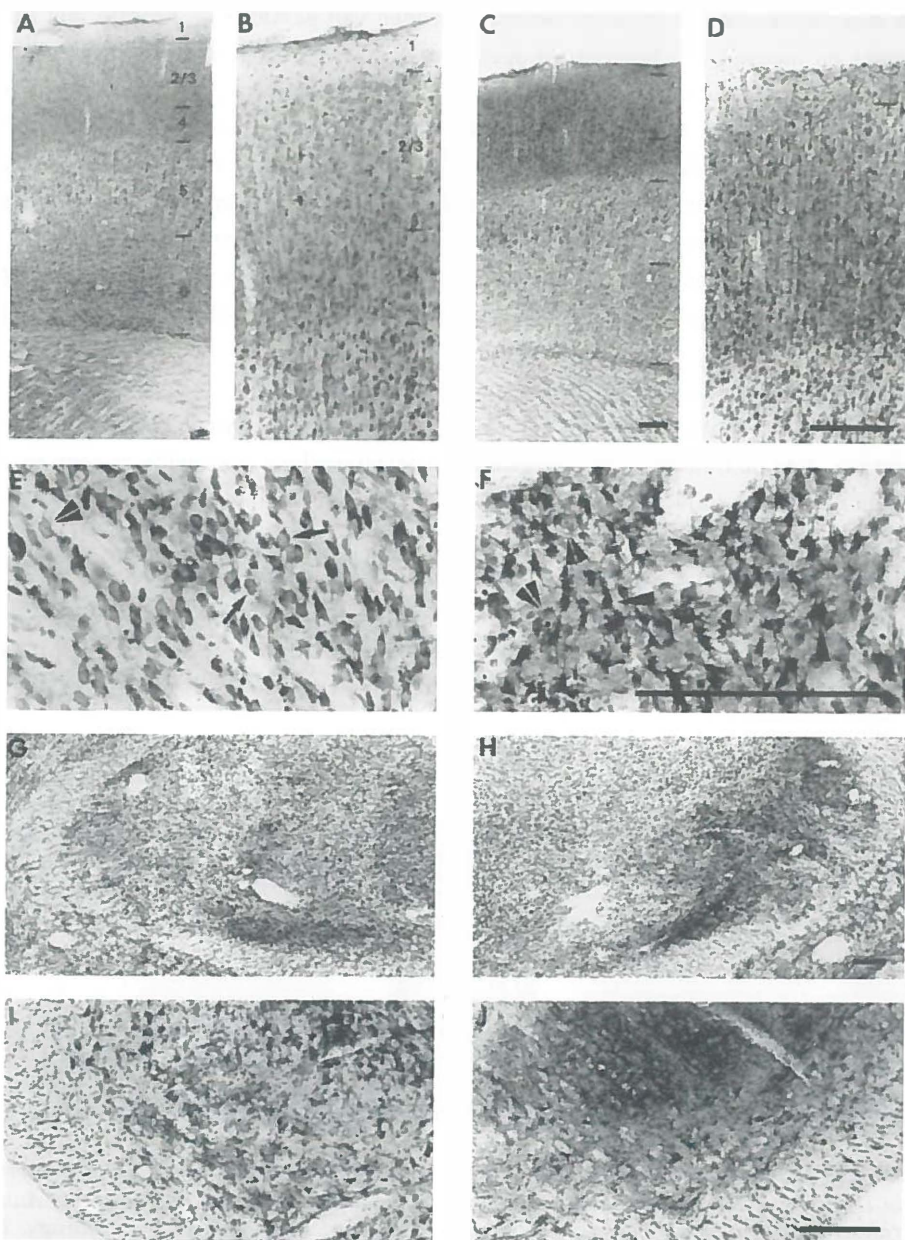
In het striatum (fig 4.3.F) gaat irreversibele IV gepaard met vervaging van de contour van de neuronen. Er zijn mogelijk gaten ontstaan in de celmembraan. Deze (licht)microscopische verandering is al in 1972 door Brown en Brierley beschreven. Zij zagen bovendien met de elektronen microscoop, dat de celmembraan van neuronen en gliacellen gaten vertoonde.

In figuur 4.4 zijn microscopische opnames getoond van coupes behandeld met zilver, 4 uur na *reversibele* IV van het ipsilaterale striatum. In de contralaterale structuren zijn niet of nauwelijks beschadigde neuronen te zien. In de ipsilaterale structuren zijn sommige gebieden partieel beschadigd. In de lagen 2 en 3 van de cortex, het laterale striatum en de laterale thalamus zijn beschadigde neuronen te zien. In de substantia nigra zijn meer neuronen beschadigd en is er neerslag van zilver tussen de cellen. Waarschijnlijk is er dus geringe beschadiging van neuronale eindplaatjes.



**Figuur 4.3.** Neuronale schade 4 uur na irreversibele IV. Intacte cellen (pijl) zijn licht gekleurd, beschadigde neuronen zwart (driehoek). Soms is er een neerslag van een zilverkorrel in een verder normaal neuron (dubbele driehoek). Linker deelfiguren (A,B,E,G,I) contralaterale hemisfeer. Rechts (C,D,F,H,J) ipsilaterale hemisfeer. A en C: frontale cortex, B en D: alleen oppervlakkige lagen hiervan. De lagen zijn genummerd volgens Zilles (1985). E en F: dorsolateraal striatum. G en H: ventrobasale thalamus. I en J: Substantia nigra reticulata. Balk = 200  $\mu$ m.





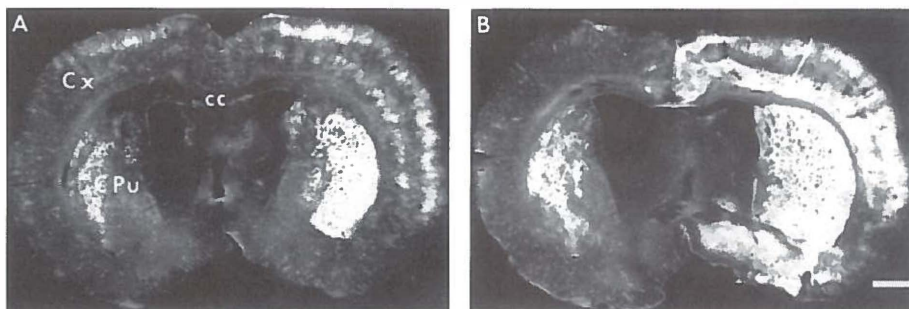
**Figuur 4.4.** Neuronale schade 4 uur na reversibele IV. Intacte cellen (pijl) zijn licht gekleurd, beschadigde neuronen zwart (driehoek). Soms is er een neerslag van een zilverkorrel in een verder normaal neuron (dubbele driehoek). Linker deelfiguren (A,B,E,G,I) contralaterale hemisfeer. Rechts (C,D,F,H,J) ipsilaterale hemisfeer. A en C: frontale cortex, B en D: alleen oppervlakkige lagen hiervan. De lagen zijn genummerd volgens Zilles (1985). E en F: dorsolateraal striatum. G en H: ventrobasale thalamus. I en J: Substantia nigra reticulata. Balk = 200  $\mu$ m.

De degeneratie in het striatum betreft neuronen van gemiddelde grootte met korte uitlopers en meestal een langere uitloper. Het gaat hier waarschijnlijk om het meest voorkomende neuron in het striatum, de medium sized spiny stellate neuron (Gerfen, 1988). De contour van de beschadigde neuronen is zeer goed te herkennen. De celmembraan is dus microscopisch nog intact. Er is ook hier neerslag van zilver tussen de neuronen, echter in veel mindere mate dan na irreversibele IV. In sommige licht gekleurde cellen in figuur 4.3 en 4.4 is een zilverkorrel te zien in de kern. Dit is mogelijk de nucleolus. Veranderingen van de nucleolus kunnen vooraf gaan aan degeneratie (Lockshin en Zakeri, 1990). Mogelijk worden deze cellen na langere recirculatie alsnog beschadigd.

#### 4.3.2. Zilverimpregnatie na 24 uur overleving

In deze sectie worden de resultaten besproken van histologische veranderingen na 24 uur overleving. Van de 6 ratten met irreversibel impedantieverloop overleefde er geen enkele gedurende 24 uur (gemiddelde overleving 8,3 uur). Van de 9 ratten met reversibel verloop overleefden er 5.

In het algemeen breidde de schade zich binnen 24 uur uit naar gebieden die na 4 uur nog niet beschadigd waren en werd de schade in al de beschadigde gebieden nog erger. Dit wordt geïllustreerd in figuur 4.5: de zilverimpregnatie breidde zich uit van caudo-lateraal naar ventromediaal striatum en in de cortex van enkele lagen naar alle lagen.



*Figuur 4.5. Toename in zilverimpregnatie tussen (A) 4 uur en (B) 24 uur recirculatie en reversibele IV. De heldere partijen geven zilveropname en dus beschadigd weefsel weer. Aan de contralaterale zijde zijn aangegeven: Cx = cortex, St = striatum, cc = corpus callosum. Balk = 1 mm.*

In tabel 4.2 wordt de zilveropname getoond 4 uur en 24 uur na hypoxie met reversibele IV. Contralateraal is de opname na 24 uur iets hoger dan na 4 uur recirculatie, de toename is echter niet significant.

Alle ipsilateraal gelegen structuren hebben een significant hogere opname van zilver na 24 uur overleving. Uitzondering hierop is de gering beschadigde hippocampus. Schade in dit gebied heeft mogelijk meer tijd nodig om te ontwikkelen. Ook de substantia nigra ondervindt geen progressieve schade, de schade was na 4 uur al bijna maximaal.

De schade is relatief hoog in de eerder genoemde gevoelige gebieden (cortex: frontaal vs caudaal, mediaal vs lateraal, oppervlakkig vs diep; striatum: dorsolateraal vs ventromediaal; thalamus: lateraal vs mediaal). Na 24 uur recirculatie volgt de schade -hoewel ernstiger dan na 4 uur- nog steeds hetzelfde patroon.

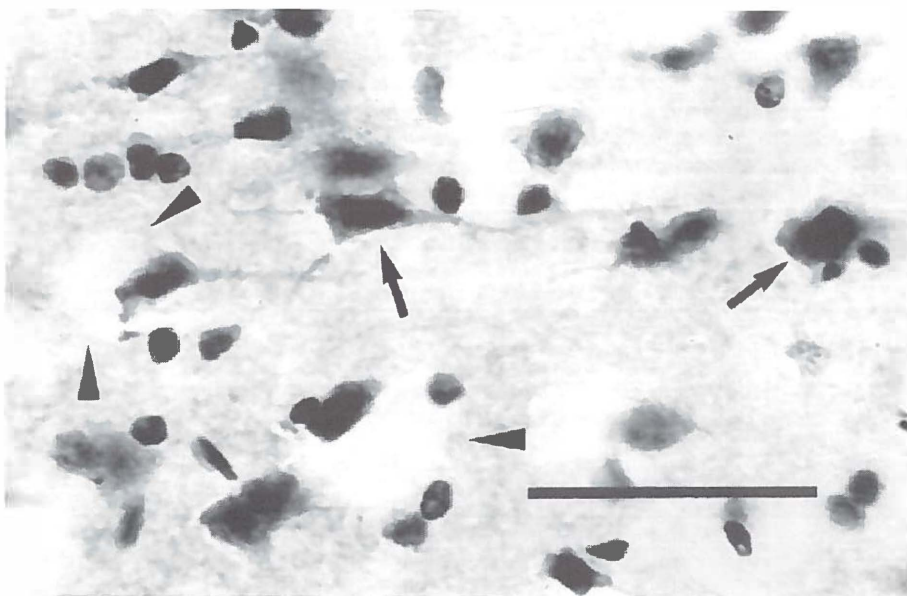
*Tabel 4.2. Toename van zilverimpregnatie tussen 4 uur en 24 uur recirculatie (reversibele IV). De zilveropname is op fotografisch negatief gemeten. Zie figuur 4.3. voor de ligging van de gebieden. A: sagittale doorsnede 0,2 mm frontaal van bregmapunt. B: sagittale doorsnede 3,3 mm caudaal, en C 5,8 mm caudaal van bregma. De gemiddelde waardes en SEM zijn aangegeven. Er is een significante toename van impregnatie tussen 4 uur en 24 uur recirculatie indien aangegeven met a  $p < 0,05$  of b  $p < 0,02$ .*

			4 UUR OVERLEVING (n=4)		24 UUR OVERLEVING (n=4)	
			contralateraal	ipsilateraal	contralateraal	ipsilateraal
A	Cortex	mediaal opp.	1,13 ± 0,14	1,16 ± 0,18	1,35 ± 0,12	1,84 ± 0,14 a
		diep	1,07 ± 0,08	1,13 ± 0,11	1,27 ± 0,10	1,65 ± 0,13 b
		lateraal opp.	1,16 ± 0,10	1,12 ± 0,11	1,34 ± 0,14	1,73 ± 0,10 b
		diep	1,14 ± 0,06	1,13 ± 0,05	1,46 ± 0,15	1,60 ± 0,13 b
	Striatum	dorsolateraal	1,26 ± 0,07	1,51 ± 0,07	1,53 ± 0,08	1,91 ± 0,09 b
		ventromediaal	1,33 ± 0,05	1,34 ± 0,11	1,48 ± 0,18	1,82 ± 0,14 a
B	Cortex	mediaal opp.	0,98 ± 0,05	0,97 ± 0,06	1,13 ± 0,07	1,55 ± 0,08 b
		diep	0,91 ± 0,04	0,94 ± 0,04	1,14 ± 0,21	1,43 ± 0,09 b
		lateraal opp.	0,85 ± 0,04	0,87 ± 0,06	1,11 ± 0,05	1,46 ± 0,15 b
		diep	0,82 ± 0,06	0,84 ± 0,08	1,06 ± 0,10	1,20 ± 0,09
	Thalamus	lateraal	1,17 ± 0,03	1,34 ± 0,12	1,23 ± 0,05	2,13 ± 0,17 b
		mediaal	1,11 ± 0,06	1,19 ± 0,05	1,18 ± 0,04	1,94 ± 0,14 b
	Hippocampus	CA1	1,07 ± 0,06	1,16 ± 0,17	1,19 ± 0,18	1,57 ± 0,19
		CA2-3	1,05 ± 0,08	0,97 ± 0,03	1,10 ± 0,13	1,18 ± 0,09
		gyrus dentatus-CA4	0,98 ± 0,04	1,24 ± 0,12	1,12 ± 0,15	1,47 ± 0,12
C	Subst. Nigra reticulata	1,68 ± 0,20	1,37 ± 0,06	1,32 ± 0,10	2,10 ± 0,08	



#### 4.3.3. Hematoxyline-eosine kleuring

Met de hematoxyline-eosine kleuring was geen schade te zien na reversibele IV. Alleen na irreversibele IV waren gebieden te herkennen met ernstige celschade. In figuur 4.1 is de pathologie in de cortex geïllustreerd. Er is kernpyknose te zien. Daarbij neemt de kern meer donkere hematoxyline kleurstof op. Dit is een teken van irreversibele celschade (Brierley, 1976). Hiernaast zijn lege ruimtes te zien waar de cytoplasmakleurstof eosine niet wordt opgenomen. In het Levine model is dit verschijnsel eerder aangetoond door Brown en Brierley (1972). Uit electronen microscopische opnames bleken dit gezwollen gliaceluitlopers te zijn. Dit ondersteunt de conclusie van het vorige hoofdstuk, dat na irreversibele IV neuronen en gliacellen beschadigd raken.



*Figuur 4.6. Detail van de frontale cortex laag 3, 4 uur na irreversibele IV. Hematoxyline-eosine kleuring. Let op donkere kernen (pijl), en op heldere vlekken (driehoek), beide tekenen van irreversibele celschade (Brierley, 1976). Balk = 50  $\mu$ m.*

#### 4.4. Commentaar

Na reversibele IV is neuronale schade beperkt tot bepaalde gevoelige gebieden. Dezelfde gebieden worden beschadigd na kortdurende complete ischemie (Pulsinelli e.a., 1982) en incomplete ischemie (Crain e.a., 1988; Lin e.a., 1990).

Een overeenkomst tussen de eerder genoemde gevoelige gebieden is, dat ze veel zenuw-eindigingen van corticale neuronen bevatten met als voornaamste transmitter glutamaat (Jones, 1985<sup>a</sup>). Er wordt bijvoorbeeld zeer intensief gesynapteerd op de oppervlakkige lagen 2 en 3 van de cortex door andere corticale neuronen. Het aangetaste cortexgebied staat uitsluitend in intensieve verbinding met de gevoelig gebleken gebieden in het striatum (McGeorge en Faull, 1989) en thalamus (Jones, 1985<sup>b</sup>). Interessant is, dat door excitatie van hetzelfde cortexgebied, alleen schade ontstaat in de gevoelige laterale thalamus (Ross en Ebner, 1990). Het is zeer goed mogelijk dat uitstoot van glutamaat maar ook van dopamine (Globus e.a., 1987), de oorzaak is van de selectieve schade na reversibele IV.

De substantia nigra reticulata was ondanks reversibele IV ernstig beschadigd. In dit gebied bleek bij geringe daling van de doorbloeding veel melkzuur te ontstaan, glia-celzwellling op te treden en er bleken gaten in membranen van neuronen en gliacellen te ontstaan (Inamura e.a., 1988). Dit impliceert, dat in het repetitieve model ondanks reversibele celzwellling in het striatum, in de substantia nigra toch irreversibele celzwellling kan optreden. Het geeft bovendien een indicatie, dat melkzuuracidose een oorzaak kan zijn van de gevonden ernstige schade.

Na irreversibele IV was er niet een dergelijk selectief patroon van neuronale schade te herkennen. De schade was van vergelijkbare ernst in gevoelige en ongevoelige gebieden. Daarnaast is al genoemd, dat er verschillende aanwijzingen zijn dat de gliacellen beschadigd zijn: De heldere vlekken in de H-E gekleurde coupe en de schade aan celmembranen in de met zilver behandelde coupes wezen hierop. Daarom is het zeer waarschijnlijk, dat er sprake is van een infarct na irreversibele IV. Er is dus niet alleen een kwantitatief verschil tussen irreversibel en reversibel impedantieverloop maar ook een kwalitatief verschil.

#### 4.5. Conclusies

Na reversibele IV is de schade selectief. Er ontstaat na 4 uur recirculatie alleen schade in specifieke gedeeltes van de cortex, het striatum en de thalamus. Bovendien zijn er sterke aanwijzingen dat hierbij de celmembraan intact blijft. Gedurende 24 uur overleving wordt de schade ernstiger, maar blijft hierbij het selectieve patroon volgen. Er is hier waarschijnlijk sprake van geprogrammeerde celdood of apoptose (Lockshin en Zakeri, 1990).

Na irreversibele IV is de hersenschade aselectief. Gevoelige en ongevoelige gedeeltes van de cortex, striatum en thalamus raken gelijkelijk beschadigd. Bovendien treedt acuut (membraan)schade op in gliacellen en neuronen. Er is dan waarschijnlijk sprake van een infarct.

Irreversibele IV in het striatum is een goede parameter om het ontstaan van een infarct aan te tonen. Het is van belang een behandeling te vinden, die irreversibele celzwellen en het daaraan gerelateerde infarct kan voorkomen.

## 5. Het effect van een aantal farmaca op het impedantie-verloop

### 5.1. Inleiding

Bij ischemische celzwellen zijn twee belangrijke factoren in het spel. Dat zijn enerzijds de cellulaire instroom van ionen en anderzijds het falen om ionen weer naar buiten te pompen. De instroom geschiedt door ionkanalen. Deze kanalen gaan open of doordat een receptor wordt gestimuleerd (receptor afhankelijk kanaal, RAK) of doordat de cel depolariseert (voltage afhankelijk kanalen, VAK). De uitstroom van ionen is afhankelijk van een aan een ATPase gekoppelde carrier (Hansen, 1985). Tijdens ischemie worden excitatoire neurotransmitters uitgestoten en openen RAK's en VAK's. Daarnaast worden de ATPasen beschadigd door vrije zuurstof radicalen (Palmer e.a., 1985) of in functie belemmerd door hypoperfusie (Dietrich e.a., 1989).

In dit hoofdstuk wordt het effect van een aantal maatregelen besproken, die bovengenoemde processen blokkeren of voorkomen. Onderzocht werd het effect van MK-801 (blokker NMDA afhankelijk RAK), nimodipine (blokker VAK voor  $\text{Ca}^{2+}$ ), indomethacine en allopurinol (blokkeren vrije radicaalschade, Palmer e.a., 1985) en ketanserine (voorkomt hypoperfusie, Dietrich e.a., 1989).

Er werd repetitief hypoxie-ischemie toegediend, totdat er irreversibele impedantiestijging optrad. Bij elke behandeling werd de weerstand tegen irreversibele impedantieverandering (IV) bepaald door het aantal nog net reversibele hypoxie periodes te tellen. Ter vergelijking was een controle groep toegevoegd, die een injectie met fysiologisch zoutoplossing had ontvangen.

### 5.2. Materialen en methoden

De bloeddruk en de impedantie werden continu gemeten. Deze gegevens werden later gedigitaliseerd met een Bitpad van Summagraphics op een Perkin en Elmer 3240 mini computer. Met behulp van de impedantiemeting werd de verandering van het extracellulaire volume (ECV) bepaald. Zie hoofdstuk 2 voor de beschrijving van de operatie en het repetitieve model.

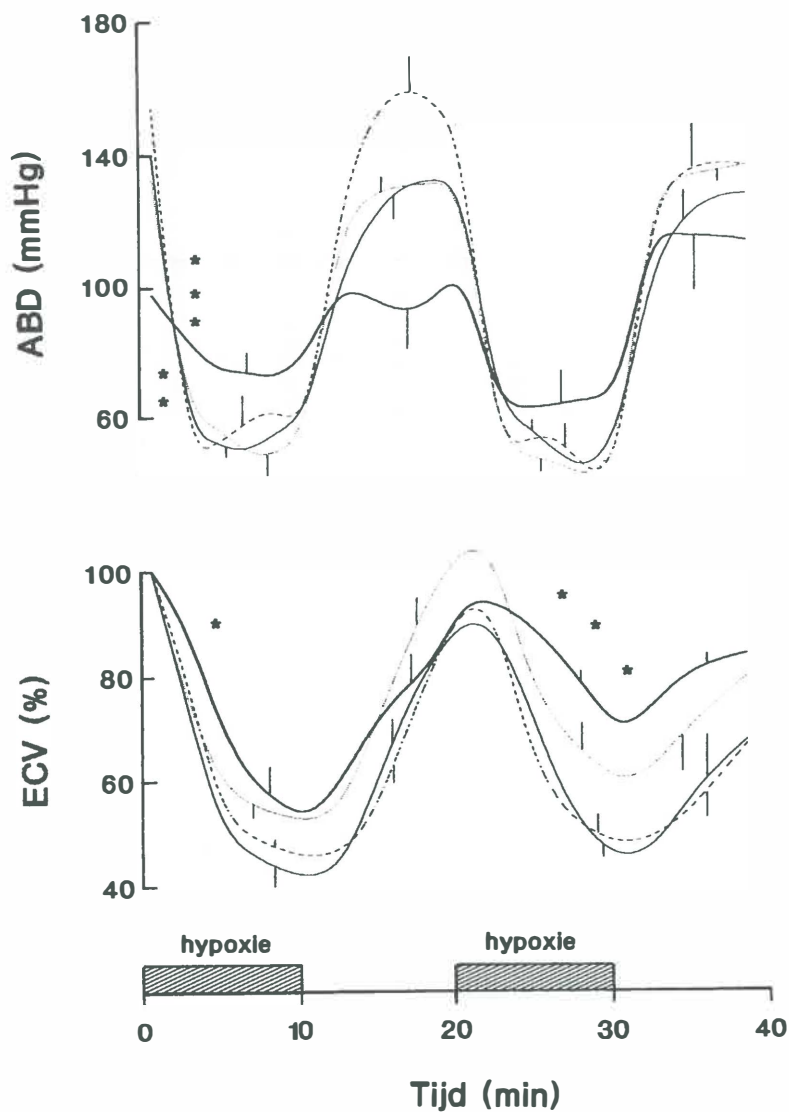
De toegediende farmaca waren verdund of opgelost in fysiologisch zout. Als controle dienden 10 ratten met een fysiologisch zout injectie van 1 ml intraveneus (i.v.). De farmaca werden 30 minuten voor het begin van hypoxie-ischemie toegediend aan telkens

4-6 ratten per behandelingsgroep. Van MK-801 werd 10 mg/kg i.v. gegeven met een infuus van een 2 mg/ml oplossing gedurende 30 minuten. Van nimodipine werd 0,5 mg/kg intraperitoneaal (i.p.) gegeven in een 0,1 mg/ml oplossing. Ketanserine (2 mg/kg) werd in een 0,1 mg/ml oplossing i.p. toegediend. Een andere groep ontving i.v. eerst 4 mg/kg indomethacine uit een 1 mg/ml oplossing en daarna 7 mg/kg allopurinol uit een 3,5 mg/ml oplossing.

Er werd maximaal 7 maal hypoxie-ischemie gegeven, en minder als er irreversibele IV optrad. Daarna werd met permanente normoxie-recirculatie begonnen.

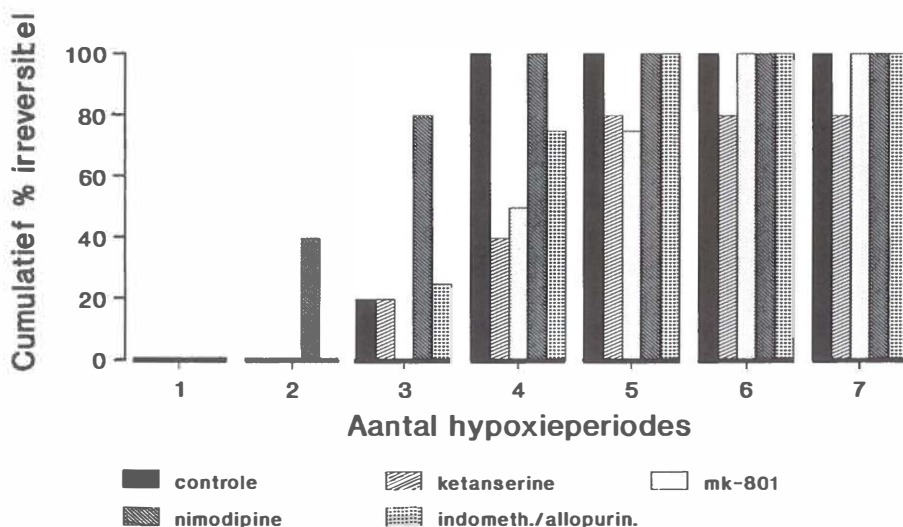
### **5.3. Resultaten en commentaar**

MK-801, noch ketanserine of indomethacine met allopurinol veranderden de respons van de bloeddruk en ECV op repetitieve hypoxie-ischemie (zie figuur 5.1). Na nimodipine injectie was de bloeddruk significant lager dan die van controles. Het vasodilaterend effect van nimodipine is hier waarschijnlijk verantwoordelijk voor (Towart en Kazda, 1982). Tijdens de eerste hypoxieperiode was de bloeddruk hoger na nimodipine injectie. Mogelijkerwijs vergroot nimodipine de pompwerking van het hart gedurende hypoxie, via dilatatie van de coronairarteriën. Nimodipine gaf met name in de tweede hypoxie periode een verminderde daling van het ECV. Tijdens deze periode was de bloeddruk niet verhoogd. Er is dus geen aan de bloeddruk gerelateerde verhoogde cerebrale bloedtoevoer, die de verschillen in het ECV kan verklaren.



*Figuur 5.1. Het effect van farmaca op de bloeddruk (ABD) en het ECV tijdens repetitieve hypoxie-ischemie. Elke lijn verbindt de gemiddelde waarde van een behandelingsgroep, de variatie (SEM) is aangeduid met balkjes. - - - - MK-801, — nimodipine, . . . . ketanserine, — indomethacine plus allopurinol. De bloeddruk en het ECV waren na nimodipine behandeling significant verschillend van controles indien aangeven met \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; of \*\*\*  $p < 0,001$ .*

Het effect van farmaca op het uitstel van irreversibele IV wordt getoond in figuur 5.2. Na 1 periode hypoxie-ischemie trad nooit irreversibele IV op. In het merendeel van de experimenten met farmaca en met controles was irreversibiliteit na 4 periodes opgetreden.



*Figuur 5.2. Het effect van farmaca op het ontstaan van irreversibele IV. De behandelingen zijn onder in de figuur aangegeven. Elke balk geeft het percentage experimenten weer, dat irreversibele IV vertoonde (na het vermelde aantal hypoxie periodes). Het percentage is cumulatief. Irreversibele IV werd door geen van de behandelingen voorkomen of significant uitgesteld.*

Na nimodipine was er na 3 periodes al hoge irreversibiliteit. Er waren significant minder periodes hypoxie-ischemie toegediend voordat irreversibele IV optrad na toediening van nimodipine ( $1,8 \pm 0,4$  tegen  $2,8 \pm 0,1$  reversibele periodes bij controles,  $p < 0,05$ ). In het diermodel met focale ischemie geeft nimodipine bescherming, omdat het de bloeddoorstroming verhoogt (Meyer e.a., 1987). Echter, nimodipine verhoogt bovendien de glucoseconcentratie in het bloed (Mohamed e.a., 1984) en in de hersenen (Heffez en Passonneau, 1985). Dit heeft een negatief effect, dat de bescherming bij modellen met complete globale ischemie teniet kan doen (Vibulsreth e.a., 1987). Bij incomplete globale ischemie is het negatieve effect van hyperglycemie nog groter (Rehncrohn e.a., 1981; Prado e.a., 1988). Hierdoor kan in ons model de balans doorslaan naar vervoegde schade.

Het aantal periodes hypoxie met nog net geen irreversibele IV was niet significant verschillend tussen controles ( $2,8 \pm 0,1$ ) en behandeling met MK-801 ( $3,8 \pm 0,5$ ), met indomethacine plus allopurinol ( $3,0 \pm 0,4$ ) of met ketanserine ( $4,0 \pm 0,8$ ). Er was dus

geen bescherming bij ingrepen op ion-kanalen, vrije radicaal vorming, of hypoperfusie.

#### **5.4. Conclusies**

Blokkers van ionkanalen zijn niet effectief genoeg om reversibele IV en uiteindelijk irreversibele IV te voorkomen. Een probleem kan zijn, dat er aselectieve kanalen zijn, waarvan nog geen blokkers bekend zijn (Yang en Sachs, 1989; Siesjö en Bengtsson, 1990). Hierdoor kunnen nog in die mate ionen verplaatsingen optreden (o.a.  $\text{Ca}^{2+}$ ) dat de cellen "overbelast" raken en de ionen niet meer kwijt kunnen.

De geteste ingrepen die de functie van ionpompen beschermen (tegen vrije radicaalvorming en hypoperfusie) waren niet effectief genoeg om irreversibele IV te voorkomen. Mogelijk zijn ook deze ingrepen te selectief.

Door secundaire effecten als verhoging van de bloedglucose spiegel kan een ingreep (nimodipine) averechts werken.





## 6. Het effect van hersenkoeling, vasten en insuline op het impedantieverloop

### 6.1. Inleiding

Het hersenmetabolisme is verantwoordelijk voor het in stand houden van de membraan potentiaal en het corrigeren van ion gradiënten over de celmembraan. In rust is ongeveer 50 % van het cerebrale zuurstofverbruik nodig om de ionpompen (met name de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) te laten functioneren (zie verder overzicht van Hansen, 1985). Tijdens ischemie hebben grote stromen ionen zich passief over de celmembraan verplaatst, waardoor celzwellling en impedantiestijging optreedt. Tijdens recirculatie moeten deze verstoorde gradiënten zich weer herstellen. Hiervoor is een intact metabolisme cruciaal. In dit hoofdstuk wordt onderzocht of bepaalde ingrepen op het metabolisme het ontstaan van irreversibele impedantieverandering (IV) kunnen voorkomen.

Afkoeling is een maatregel die in tenminste twee processen ingrijpt. De ionstromen (Morris e.a., 1991) en het metabolisme (Tanimoto en Okada, 1987) verlopen trager. Lichaamskoeling induceert daarnaast een verhoging van de zuurstofsaturatie van het bloed (Carlsson e.a., 1976). Het beschermend effect in de klassieke hypoxie-ischemie experimenten kan aldus verklaard worden door verhoogd zuurstof aanbod (Keykah e.a., 1980; Berntmann e.a., 1981). Dit probleem kan worden omzeild door uitsluitend de hersenen af te koelen (Busto e.a., 1987). In dit hoofdstuk wordt het effect van hersenkoeling tot 32 °C en tot 28 °C onderzocht.

Het is ongeveer 10 jaar bekend dat het geven van glucose voor de ischemische episode het herstel van het metabolisme bemoeilijkt (Welsh e.a., 1980, 1983; Gardiner e.a., 1982) en irreversibele verstoring van ionen gradiënten kan veroorzaken (Dienel, 1984; Warner e.a., 1987). Het bloedglucose varieert hierbij tussen de 10 en 30 mmol/l (normaal 4-8 mmol/l). Aan de andere kant is het ook lang bekend, dat ernstige hypoglycemie (< 1 mmol/l) pathologische celzwellling veroorzaakt (Pelligrino e.a., 1981). Het effect van verlagen van bloedglucose binnen het normale gebied is zelden onderzocht.

Er zijn aanwijzingen, dat het metabolisme na hypoxie-ischemie beter herstelt door geringe hypoglycemie (Gardiner e.a., 1982). Kortdurend vasten veroorzaakt een aantal metabole veranderingen waaronder een daling van bloedglucose naar 4-5 mmol/l (Ruderman e.a., 1974). In dit hoofdstuk is het effect van 48 uur vasten op het ontstaan van irreversibele IV onderzocht. Door 48 uur vasten kan het cerebrale glucose metabolisme dalen (Mans e.a., 1987) waardoor mogelijk hypothermie optreedt. Als voorzorgsmaatregel werd bij de gevaste dieren de hersentemperatuur gemeten evenals bij een groep controles.

De arteriële glucose en  $\beta$ -OH-butyraat spiegels werden gemeten om een idee te krijgen in hoeverre het metabolisme van deze stoffen is veranderd na vasten.

Een kleine dosis insuline verbetert het metabool functioneren van mitochondriën na een ischemische episode (Strong e.a., 1985). Hiervoor is de geringe hypoglycemie verantwoordelijk of mogelijk beschermt insuline onafhankelijk hiervan (Auer en Voll, 1991). De preventieve werking van een lage dosis kortwerkend insuline wordt in dit hoofdstuk beschreven.

Het effect alle genoemde behandelingen werd getest in het repetitieve model. Van elke behandeling werd bepaald of deze irreversibele IV kon voorkomen of uitstellen.

## 6.2. Materialen en methoden

De bloeddruk en de impedantie werden continu gemeten. Deze gegevens werden later gedigitaliseerd met een Bitpad van Summagraphics op een Perkin en Elmer 3240 mini computer. Met behulp van de impedantiemeting werd de verandering van het extracellulaire volume (ECV) bepaald. Zie hoofdstuk 2 voor de beschrijving van de operatie en het repetitieve model.

Dertig minuten voor het geven van hypoxie kregen 5 ratten een intraperitoneale injectie van 4 E/kg insuline (Velosulin). Gevaste ratten kregen 48 uur geen voedsel, maar wel water ( $n=6$ ). De temperatuur van het striatum werd verlaagd tot 32 °C in 4 experimenten en tot 28 °C in 5 experimenten. Bij 5 controles en 5 gevaste ratten werd de hersentemperatuur niet beïnvloed (maar wel gemeten).

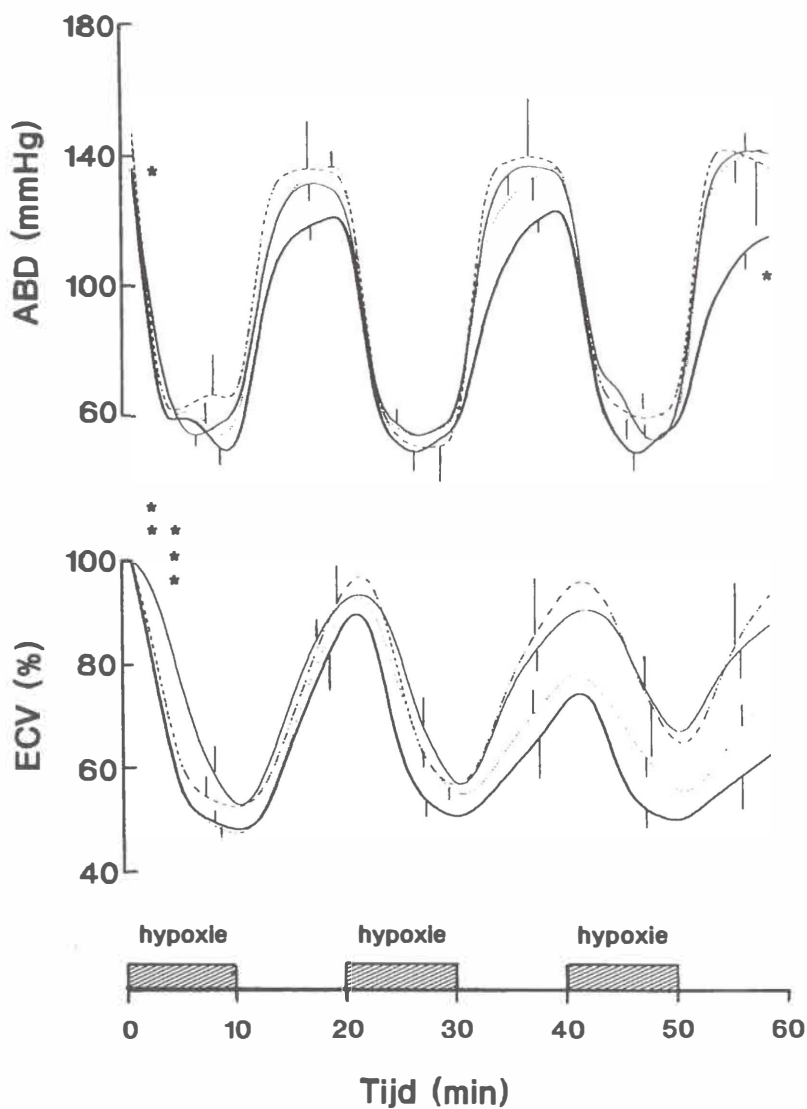
De temperatuurmeting in het ipsilaterale striatum vond plaats via een thermokoppel (DKM-25030A, Ellab, Kopenhagen, Denemarken). Dit thermokoppel met een diameter van 0,25 mm werd tussen de impedantie electrodes in het linker striatum geplaatst. De punt stak 1 mm boven de punten van de impedantie electrodes uit. De aflezing van de temperatuur gebeurde op een digitale meter (DK-3, Ellab). De hersenen werden gekoeld door op de schedel aluminiumfolie te leggen en dit met (ijs)water te bedekken. Een lamp zorgde voor het warmhouden van het lichaam (37 °C). De repetitieve hypoxie begon nadat de hersen- en lichaamstemperatuur waren gestabiliseerd.

Voor en na repetitieve hypoxie werd 0,5 ml arterieel bloed afgenomen bij gevaste dieren en controles. Het glucosegehalte van geheel bloed werd bepaald in een spectrofotometer (type YSI 23 AM, Yellow Springs Instrument Corp., Yellow Springs, Ohio, VS). Het gehalte aan  $\beta$ -OH-boterzuur werd fluorimetrisch bepaald (volgens Williamson en Mellanby, 1970).

### 6.3. Resultaten

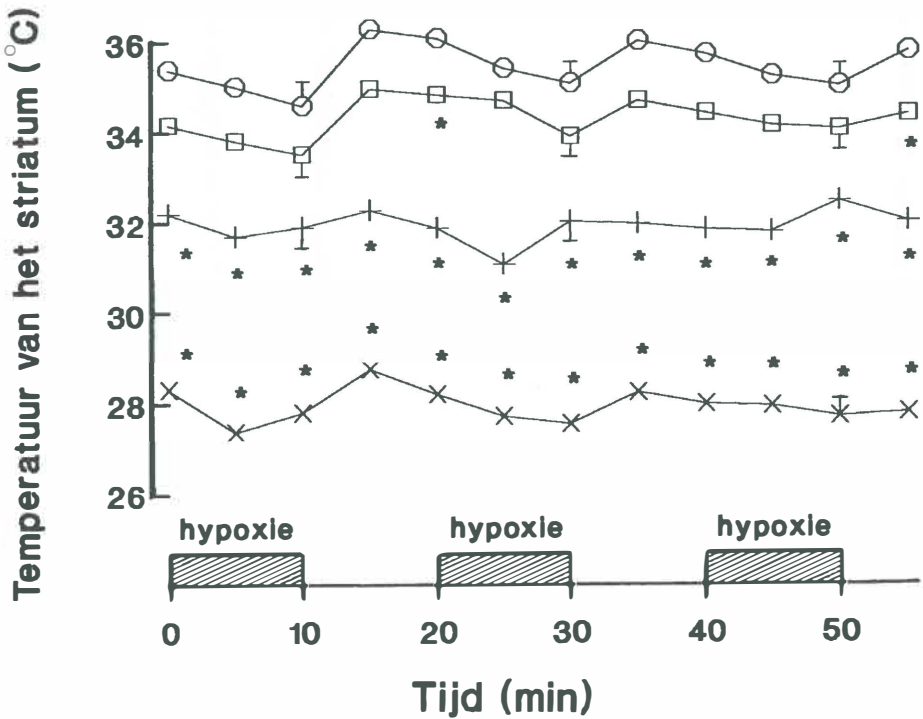
De veranderingen van het extracellulaire volume (ECV) en de bloeddruk (ABD) worden vermeld in figuur 6.1. Hersenkoeling tot 28 °C gaf tijdens de eerste hypoxie-ischemie een significant tragere daling van het ECV dan bij controles. De normale iongradiënt over de celmembraan blijft dus langer aanwezig. Dit kan een teken zijn van vertraagd metabolisme (minder omzetting van Crp en later ATP) of verminderde cellulaire doorlaatbaarheid voor ionen (Hansen, 1985). De maximale daling van het ECV tijdens hypoxie-ischemie was bij de experimenten met hypothermie en normothermie van dezelfde orde van grootte. Uiteindelijk zijn de ionverplaatsing en energiedepletie (Busto e.a., 1987) blijkaar maximaal.

Bij 48 uur gevasten daalde de bloeddruk tijdens de eerste hypoxie sneller dan bij controles (zie figuur 6.1). Daarnaast herstelde de bloeddruk slechter na de derde hypoxie-periode. Na 48 uur vasten is er minder glucose voor het hart beschikbaar (zie tabel 6.1 en tabel 7.1). Het hart wordt overmatig belast door hypoxie (de verlaagde bloeddruk kan een teken hiervan zijn). Waarschijnlijk wordt de hartfunctie door verminderde beschikbaarheid van glucose na vasten nog lager. De relatieve verlaging van de bloeddruk heeft geen effect op het ECV. Het lijkt er dus op dat de aanvoer van substraat aan het striatum door vasten niet slechter wordt.



*Figuur 6.1. Veranderingen van de bloeddruk (ABD) en het ECV tijdens repetitieve hypoxie. Elke lijn verbindt de gemiddelde waarden van een behandelings groep, de balkjes geven de variatie (SEM) aan. .... controles, - - - - 32 °C hersentemperatuur, — 28 °C hersentemperatuur, — 48 uur gevast. De bloeddruk was bij gevasten (n=6) en het ECV was bij 28 °C hypothermie (n=5) verschillend van controles (n=10) indien aangegeven met \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,005$  of \*\*\*  $p < 0,001$ .*

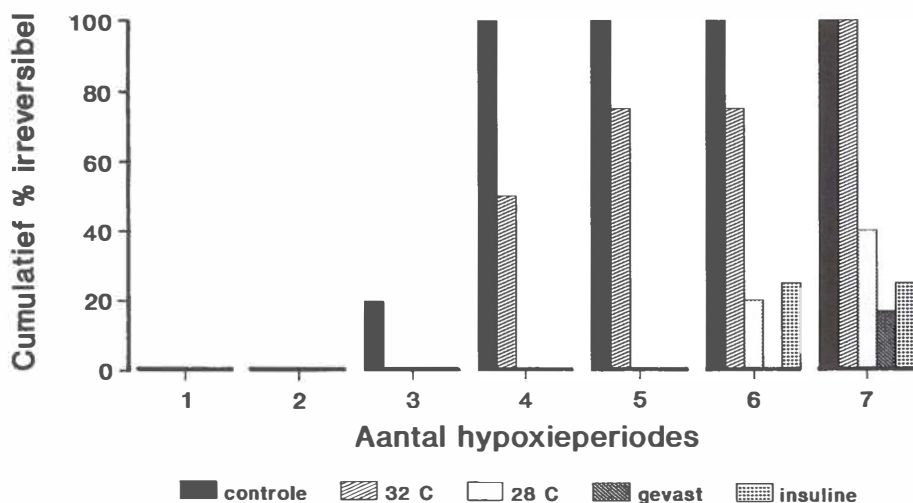
Figuur 6.2 toont de hersentemperatuur ipsilateraal van de carotis occlusie tijdens repetitieve hypoxie. Tijdens hypoxie was er meestal een dalende trend, en tijdens normoxie een herstel. De verschillen tussen hypoxie en normoxie waren echter klein. Uit de figuur blijkt dat het goed lukt om de hersenen tot 32 °C of tot 28 °C te koelen. Bij de controle-dieren en de gevaste dieren werd de hersentemperatuur niet geregeld en fluctueerde respectievelijk tussen de 35-36 °C en 34-35 °C. Het verschil was ongeveer 1 °C en dit was op twee van de twaalf meetpunten significant ( $p < 0,02$ ). De temperatuur was in de gevaste groep op elk moment hoger dan in de groep met 32 °C hypothermie ( $p < 0,01$ ).



Figuur 6.2. Temperatuur gemeten in het ipsilaterale striatum. De symbolen geven de gemiddelde temperatuur weer (van  $n=4-5$ ) en de balkjes geven de variatie (SEM) aan indien groter dan symbolen.  $\circ$  controles,  $\square$  48 uur vast,  $+$  hersenkoeling tot 32 °C,  $\times$  hersenkoeling tot 28 °C. Significant verschil van controles is aangegeven met  $* p < 0,02$ .

Het effect van behandelingen op het uitstel van irreversibele IV wordt getoond in figuur 6.3. Na 2 periodes hypoxie-ischemie trad geen irreversibiliteit op. Na 4 periodes was de

IV altijd irreversibel in de controlegroep (aantal nog net reversibele periodes was  $2,8 \pm 0,1$ ). In de groep met 32 °C hypothermie gebeurt dit na 5 periodes (reversibiliteit  $4,0 \pm 0,7$ ). Het uitstel was niet significant. Diepere hypothermie (28 °C) stelde irreversibele IV wel significant uit (gemiddeld  $6,4 \pm 0,4$  reversibele periodes,  $p < 0,001$ ). Na 7 hypoxieperiodes was irreversibele IV nog zeldzaam (20 %, zie fig 6.3). In vergelijking met de studie van Busto e.a. (1987) is er sterkere temperatuurdaling nodig voor bescherming. In zijn studie werden echter gevaste dieren gebruikt, en dit kan al enige bescherming hebben geboden.



*Figuur 6.3. Het effect van behandelingen op het ontstaan van irreversibele IV. De behandelingen zijn onder in de figuur aangegeven. Elke balk geeft het percentage experimenten weer, dat irreversibele IV vertoonde (na het vermelde aantal hypoxie periodes). Het percentage is cumulatief. Irreversibele IV werd significant uitgesteld door 28 °C hersenkoeling, vasten en insuline (zie tekst).*

Na 48 uur vasten was er in geen van de experimenten na 7 hypoxieperiodes al irreversibele IV. Het aantal reversibele periodes was significant hoger dan bij de controles ( $6,8 \pm 0,2$ ;  $p < 0,0002$ ). Eerder in dit hoofdstuk is geconstateerd, dat de temperatuur van het striatum in de gevaste groep niet wezenlijk verschilde van controles. Daarnaast was de temperatuur na vasten op elk moment significant hoger ( $p < 0,01$ ) dan in de groep die geen bescherming ondervond van 32 °C hypothermie. De bescherming moet dus worden toegeschreven aan het vasten en niet aan de verlaging van de temperatuur.

Tabel 6.1. Concentraties van glucose en  $\beta$ -OH-butyraat in arterieel bloed voor en na repetitieve hypoxie. Een significant verschil tussen 48 uur gevasten en controles wordt aangegeven met a  $p < 0,05$  of b  $p < 0,02$ .

		Voor hypoxie		Na hypoxie		(mmol/l)
		glucose	$\beta$ -OH-butyraat	glucose	$\beta$ -OH-butyraat	
controles	(n=5)	5,60 $\pm$ 0,33	0,03 $\pm$ 0,03	5,64 $\pm$ 0,26	0,04 $\pm$ 0,04	
48u gevast	(n=5)	4,10 $\pm$ 0,19 a	0,97 $\pm$ 0,15 a	4,54 $\pm$ 0,36	0,70 $\pm$ 0,27 b	

Tabel 6.1 toont de concentratie van glucose en  $\beta$ -OH-butyraat in het bloed. De gemiddelde glucoseconcentratie was na 48u vasten gedaald van 5,6 naar 4,1, de  $\beta$ -OH-butyraat concentratie gestegen van 0,03 naar 0,97. Deze verschillen waren afgenomen na repetitieve hypoxie-ischemie. Tijdens normoxie-recirculatie kan  $\beta$ -OH-butyraat worden geoxideerd als vervanging van glucose (Ruderman e.a., 1974). Na injectie van insuline (4 E/kg) daalde de glucosespiegel in het bloed eveneens (zie hoofdstuk 7.3.2). De ketonlichaamconcentratie in het bloed daalt na insuline injectie. Er kon geen  $\beta$ -OH-butyraat in het bloed worden bepaald, omdat de concentratie onder de detectielimiet van de bepaling kwam.

Na insulineinjectie trad na 7 periodes zelden irreversibele IV op (zie fig 6.3). Het uitstel van irreversibele IV was na insuline injectie hoog significant ( $6,5 \pm 0,5$  reversibele periodes,  $p < 0,002$ ). In het volgende hoofdstuk zal worden onderzocht wat het effect van vasten en insuline is op glucose in bloed en hersenen.

#### 6.4. Conclusies

De hersenen moeten in het repetitieve model relatief sterk gekoeld worden voor bescherming tegen irreversibele IV. Na vasten was de daling van hersentemperatuur gering (1 °C) en kan niet dé oorzaak zijn dat vasten irreversibel IV voorkwam. Daling van de glucosespiegel in het bloed kan hersenschade voorkomen indien dit samengaat met verhoogde  $\beta$ -OH-butyraatconcentratie (vasten) of in combinatie met verhoogde insulinespiegel.





## 7. Het effect van vasten en insuline op glucose in bloed en striatum

### 7.1. Inleiding

In het vorige hoofdstuk is aangetoond, dat na vasten en insuline injectie bescherming optreedt voor irreversibele impedantie stijging in het repetitieve model. Er zijn aanwijzingen, dat het cerebrale metabolisme van glucose verandert door vasten (Ruderman e.a., 1974; Pardridge en Oldendorf, 1975; Mans e.a., 1987) en insuline (Daniel e.a., 1975; Namba e.a., 1987). Deze studies beperkten zich echter tot het onderzoek naar de veranderingen in rust.

Tijdens hypoxie-ischemie zijn nog niet dergelijke studies verricht. In dit hoofdstuk wordt geprobeerd de invloed van vasten en insuline op de veranderingen van het glucose-metabolisme tijdens repetitieve hypoxie te karakteriseren. Daarvoor wordt de methode van microdialyse van de extracellulaire vloeistof toegepast, omdat hiermee glucose continu bepaald kan worden (van der Kuil en Korf, 1991). Daarnaast is glucose in veneus bloed bepaald. Een enkele meting is onvoldoende, omdat glucose sterk kan veranderen door hypoxie en die respons verschillend kan zijn tussen controles en behandelde dieren. De meting is gedaan op meerdere momenten tijdens repetitieve hypoxie-ischemie.

### 7.2. Materialen en methoden

De behandeling bestond enerzijds uit het onthouden van voedsel gedurende 24 uur ( $n=5$ ), en anderzijds uit het geven van een intraperitoneale injectie van 4 E/kg insuline 30 min voor het begin met repetitieve hypoxie ( $n=5$ ). Er dienden 5 ratten als controle, welke meting van glucose in het dialysaat en in bloed ondergingen zonder behandeling vooraf. Er werd repetitieve hypoxie gegeven, totdat de impedantie irreversibel steeg met een maximum van 7 periodes.

Minimaal 1 dag voor de operatie werd een rechte dialyseslang van cellulose met een diameter van 100  $\mu\text{m}$ , permeabel tot een molecuulgewicht van 10.000, geprepareerd door een gedeelte te bedekken met siliconenlijm. Het 3,5 mm brede onbedekte gedeelte werd in transversale richting in het linker striatum geplaatst. De impedantie electrodes werden er 0,5 mm boven gezet. De dialysecanule werd doorstroomd met kunstmatige extracellulaire vloeistof zonder glucose (120 mM NaCl, 15 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM KCl, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$  op pH 7.4 na doorborrelen met 95 %  $\text{O}_2$ / 5 %  $\text{CO}_2$ ). De perfusie-

snelheid was 7  $\mu$ l/min. Glucose werd continu bepaald door de uitstromende vloeistof te mengen met reagens met 1.6 E Hexokinase (ATP:D-hexose-6-fosfotransferase, EC 2.7.1.1; 140 E/mg uit gist, Boehringer, Mannheim), 0,8 E glucose-6-fosfaat dehydrogenase (D-glucose-6-fosfaat:NADP 1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49, 140 E/mg, uit gist, Boehringer Mannheim), 0,4 mM ATP (Sigma, St Louis, MO, USA) en 3 mM NADP (Boehringer, Mannheim) in een Tris buffer (200 mM Tris, 2 mM  $MgCl_2$  en 0,2 mM EDTA, pH 8,0). De fluorescentie van het eindproduct NADPH voor UV-licht werd bepaald bij een excitatie frequentie van 320-400 nm en emissie bij 400-700 nm. Voor elk experiment werd een standaard van 50  $\mu$ M en 100  $\mu$ M aan het systeem aangeboden. Nadat de dialysecannule aan het systeem werd gekoppeld en het glucose signaal stabiliseerde (na  $\pm$  30 min) werd repetitieve hypoxie-ischemie gegeven.

Er werd voor en tijdens repetitieve hypoxie 0,2 ml bloed afgenomen voor de bepaling van glucose. Dit werd op ijs bewaard en binnen 2 uur werd de glucoseconcentratie bepaald met een spectrofotometer van Yellow Springs Instr. Co, type YSI 23 AM, Yellow Springs, Ohio, VS.

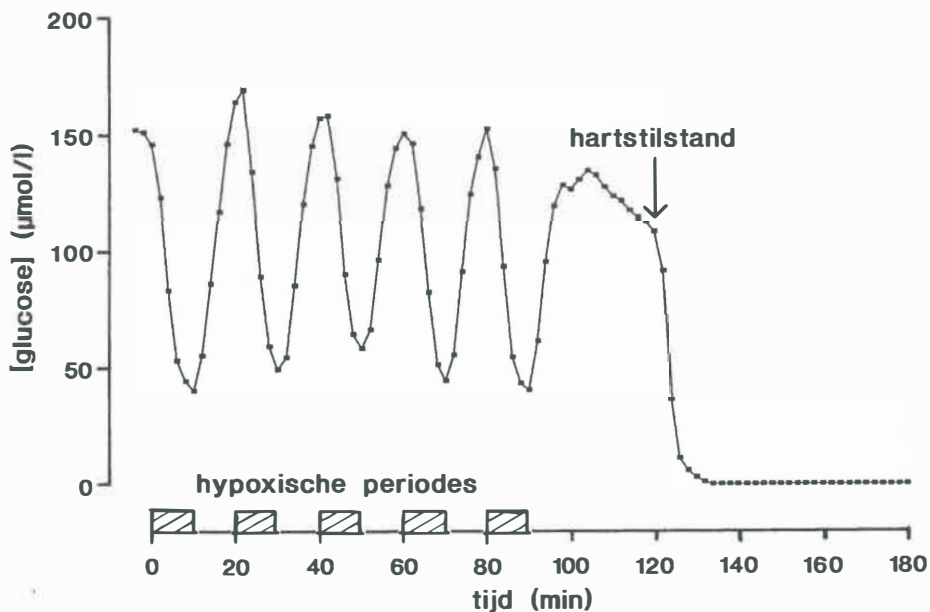
Een verandering van glucose in het bloed kan consequenties hebben voor glucose in dialysaat. Om hiervoor te corrigeren is de verhouding van glucose in dialysaat over glucose in bloed berekend. Dit is een maat voor de effectiviteit waarmee het uit het bloed afkomstige glucose in het dialysaat terecht komt (recovery). Deze recovery is vergeleken tussen gevaste dieren en controles (zie tabel 7.1)

## 7.3. Resultaten

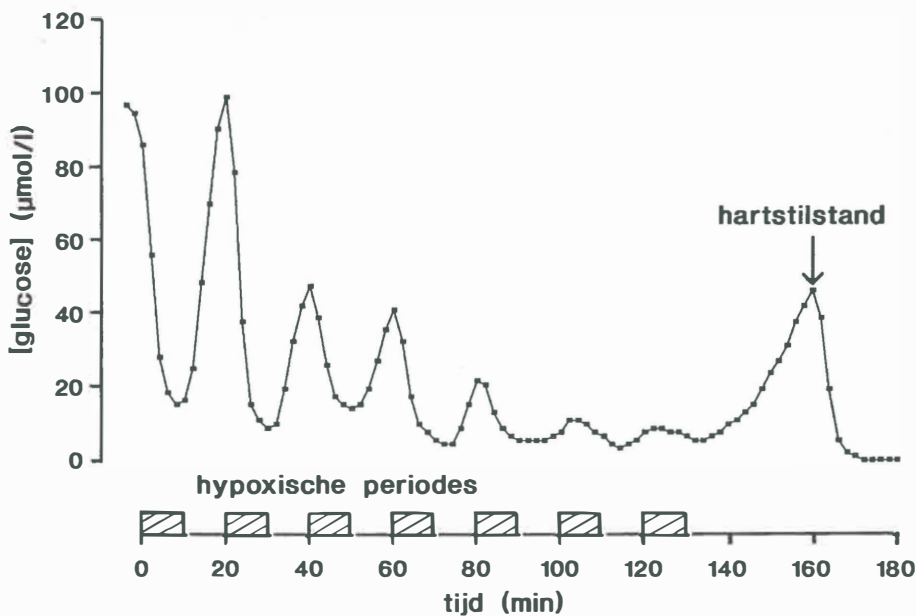
### 7.3.1. De verandering van glucose in dialysaat.

Figuur 7.1. toont dat bij een controle experiment de glucoseconcentratie in dialysaat daalde tijdens hypoxie-ischemie en weer steeg tijdens normoxie-recirculatie. Gedurende recirculatie na de laatste hypoxieperiode steeg de impedantie in alle controles irreversibel (niet getoonde data). Desondanks normaliseerde de concentratie van glucose in het dialysaat vrijwel volledig. Dit betekent, dat irreversibele impedantiestijging niet wordt veroorzaakt door een tekort aan extracellulair glucose.

Van een gevaste rat is een typisch experiment getoond in figuur 7.2. Ook hier daalde en steeg glucose in het dialysaat meerdere malen, echter herstel treedt in steeds mindere mate op. Glucose steeg na de laatste hypoxieperiode weer aanzienlijk. Het impedantieverloop was na 7 hypoxieperiodes altijd reversibel (niet getoond).

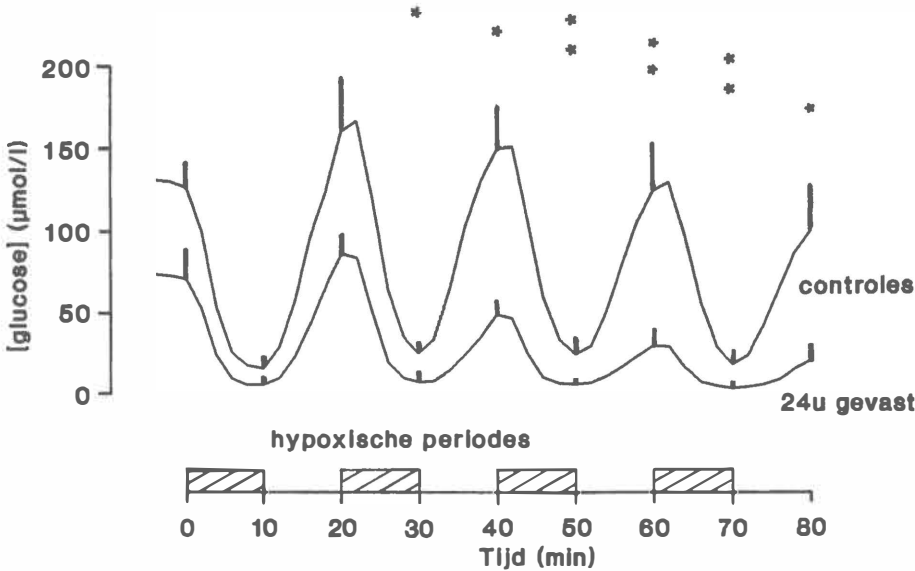


Figuur 7.1: Verandering van de glucoseconcentratie in het dialysaat van het linker striatum. Een karakteristiek controle-experiment.



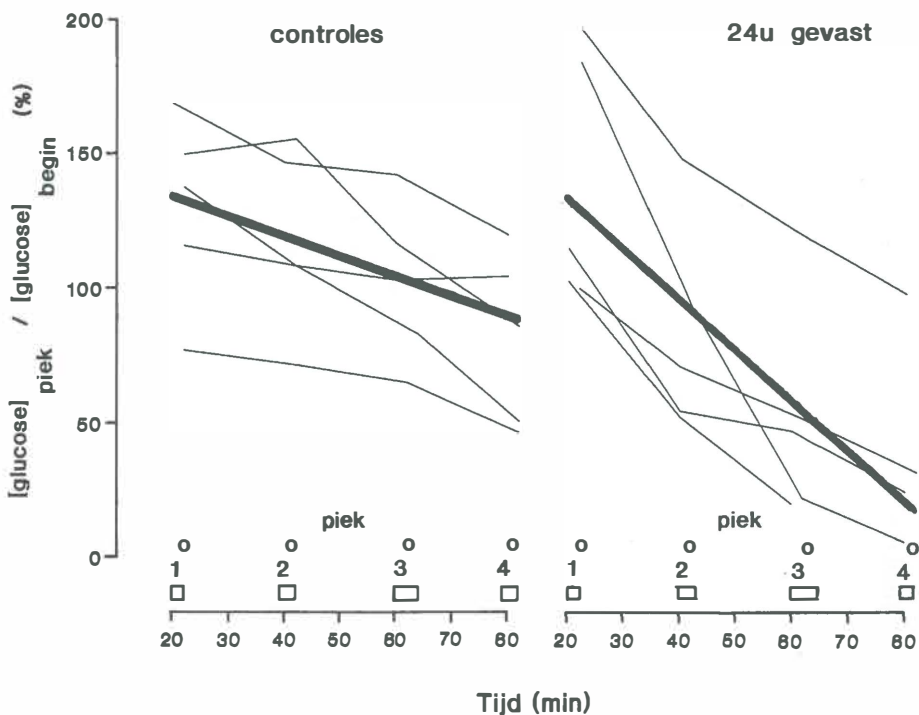
Figuur 7.2: Verandering van de glucoseconcentratie in het dialysaat uit het linker striatum: Een karakteristiek experiment met een 24 uur gevaste rat.

De gemiddelde concentraties van glucose in dialysaat worden getoond in figuur 7.3. Gedurende repetitieve hypoxie is de gemiddelde glucose concentratie in gevaste dieren lager dan in controles. Het verschil is statistisch significant vanaf de tweede hypoxie periode.



Figuur 7.3: Verandering van de glucoseconcentratie in striataal dialysaat tijdens repetitieve hypoxie-ischemie. De gemiddelde waarden en de SEM (balken) van controles en gevaste dieren zijn aangegeven. De verschillen tussen beide groepen zijn elke 10 min getoetst en indien significant aangegeven met \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,02$  of \*\*\*  $p < 0,01$ .

Tijdens de opeenvolgende periodes van normoxie-recirculatie zijn de piekwaardes van glucose in dialysaat bepaald. De relatieve piekwaardes t.o.v beginniveau zijn uitgezet tegen de momenten waarop dit niveau werd bereikt (zie figuur 7.4).



Figuur 7.4: Piekwaardes van glucose in het dialysaat gedurende repetitieve hypoxie. De piekwaardes worden uitgedrukt als percentage van de absolute concentratie op tijdstip 0. De piekwaardes van elk experiment worden verbonden door een dunne lijn. De gemiddelde daling van de groep controles (links) en 24 uur gevaste dieren (rechts) wordt aangegeven met een dikke lijn. Let op de steilere helling in de gevaste groep vergeleken met controles.

De lijn die de trend van de punten het best benadert is bepaald met lineaire regressie. De helling en de y-intercept van deze lijnen zijn vergeleken tussen wel en niet gevaste dieren. De gemiddelde relatie tussen tijd en glucosepercentage is bij controles:

$$[\text{glucose}]_t / [\text{glucose}]_{t_0} = (-0.75 \pm 0.18) \cdot t + (149 \pm 19)$$

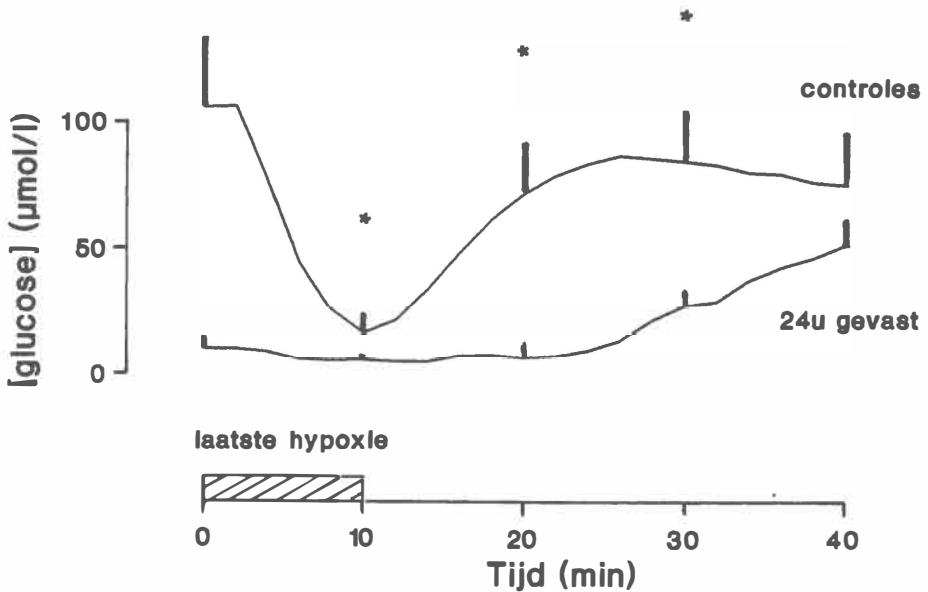
en bij 24 uur gevasten:

$$[\text{glucose}]_t / [\text{glucose}]_{t_0} = (-1.86 \pm 0.35) \cdot t + (171 \pm 25)$$

Het verschil in helling is significant ( $p < 0,05$ , tweezijdige Mann-Whitney U). Conclude-

rend, tijdens repetitieve hypoxie herstelde extracellulair glucose zich progressief slechter. Deze progressie was in significant sterkere mate aanwezig na 24 uur vasten.

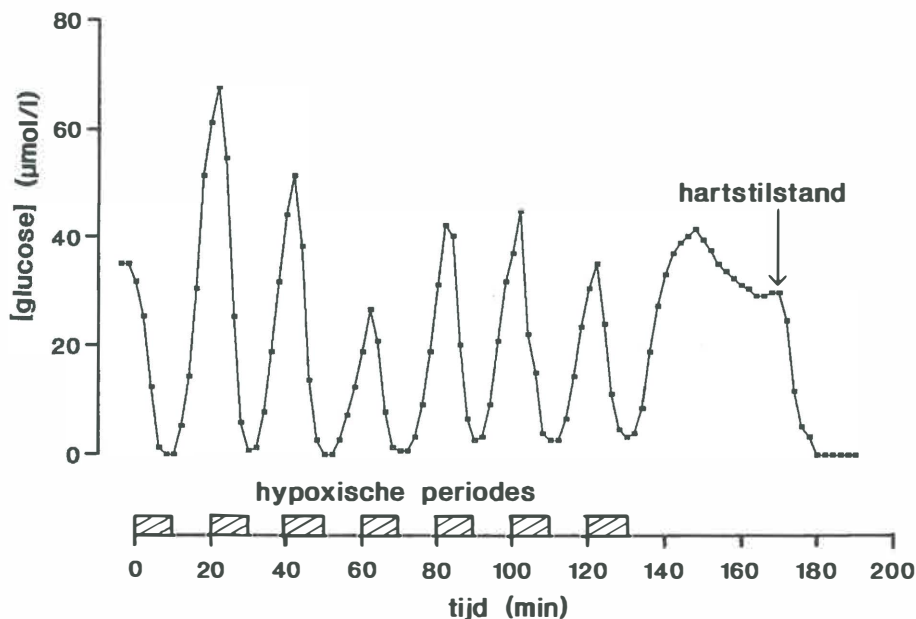
Uit figuur 7.5 blijkt, dat 10-20 min na het beëindigen van repetitieve hypoxie de glucose concentratie van dialysaat bij gevaste dieren significant lager was dan bij controles. Na 30 min recirculatie was glucose in dialysaat niet meer significant verschillend tussen beide groepen. Na vasten geschiedt het (praktisch volledige) herstel van extracellulair glucose dus trager.



*Figuur 7.5. Verandering van de glucoseconcentratie in striataal dialysaat tijdens de laatste hypoxieperiode. De gemiddelde waarden en de SEM (balken) van controles en gevaste dieren zijn aangegeven. De verschillen tussen beide groepen zijn elke 10 min getoetst en significant indien aangegeven met \*  $p < 0,05$ .*

In figuur 7.6 wordt een pilot experiment getoond van glucosedialyse na een injectie van 4 E/kg insuline. In dit (en nog een gereproduceerd experiment) was glucose in dialysaat op elk meetmoment lager dan in de 5 controles was gezien. De basaalwaarde en de

glucosewaarden tijdens repetitieve hypoxie lijken op die van gevaste dieren. Echter, het snelle herstel van de glucosespiegel na insuline injectie werd niet in gevaste dieren gezien. Het snelle herstel is opvallend, omdat op dit moment de bloedglucose concentratie laag was ( $1.4 \pm 0.4$  mM,  $n=3$ ). Er zijn additionele proeven nodig om het effect van insuline op extracellulair aangeboden glucose nader te bepalen.



*Figuur 7.6. Verandering van de glucoseconcentratie in het dialysaat van het linker striatum. Een karakteristiek experiment na injectie van 4 E/kg insuline.*

### 7.3.2. De verandering van glucose in bloed

Na 24 uur vasten was de bloedglucose spiegel lager dan bij controles op elk meetpunt tijdens repetitieve hypoxie (zie figuur 7.7 en tabel 7.1). Vóór insuline injectie (4 E/kg i. v.) was de veneuze glucoseconcentratie  $6,5 \pm 0,8$ , 15 minuten erna  $4,2 \pm 0,2$ . De laatste waarde komt overeen met meetpunt 1 in figuur 7.7. Vanaf dit moment was de glucosespiegel in de behandelde dieren lager dan in de controles (zie tabel 7.1). Na 7 hypoxieperiodes was glucose gedaald tot  $1,4 \pm 0,6$  mmol/l. Concluderend, vasten en insuline geven een geringe maar consistente daling van bloedglucose tijdens repetitieve hypoxie.





van glucose is een normale respons bij stress (Weissman, 1990), en zoals hier blijkt ook bij hypoxie-ischemie. Deze respons wordt sterk verminderd door vasten of door insuline en er treedt blijkaar gewenning op bij repetitieve hypoxie.

### *7.3.3. De verandering van de recovery*

De glucose recovery -een maat voor de efficiëntie waarmee glucose vanuit het bloed het dialysaat bereikt- was veel lager tijdens hypoxie (meetpunten 3 en 6) dan tijdens normoxie (meetpunten 1,2,4 en 5).

De recovery was bovendien lager bij 24 uur gevasten dan bij controles. Het verschil tussen beide groepen is significant tijdens de derde hypoxie. Na vasten werd het transport van glucose vanuit het bloed naar het dialysaat dus belemmerd.

Glucose dat in het dialysaat terecht komt is afkomstig uit de extracellulaire ruimte. Glucose in de extracellulaire ruimte wordt aangevoerd uit het bloed en mogelijk uit de cellen. De omzetting van glucose in de cel is zeer effectief ( $K_m$  van hexokinase =  $\pm 10 \mu\text{M}$ ). De uitstroom van glucose uit de cel is daarom waarschijnlijk verwaarloosbaar. Extracellulair glucose wordt dan voornamelijk bepaald door de snelheid van aanvoer van glucose uit het bloed (hoge  $K_m$  voor BHB transport = 5-10 mM) enerzijds en de snelheid van afvoer van glucose naar de intracellulaire ruimte anderzijds (Pardridge, 1983). Na vasten was glucose in dialysaat verlaagd. Dit betekent, dat de aanvoer van glucose vanuit het bloed was gedaald, of de afvoer en omzetting van glucose door de cellen was verhoogd.

## **7.4. Conclusies**

De belangrijkste resultaten van dit hoofdstuk kunnen als volgt worden samengevat: Door vasten en insuline daalde de bloedglucosespiegel met 1-4 mmol/l gedurende repetitieve hypoxie. In het begin ging dit samen met een in ongeveer gelijke mate verlaagde glucose concentratie in dialysaat. Later was de daling van glucose in dialysaat relatief sterker dan de daling van bloedglucose. Bovendien was bij gevaste dieren het herstel van het extracellulaire glucose gedurende opeenvolgende normoxieperioden slechter dan bij controles.

De verlaging van extracellulair glucose kan enerzijds ontstaan doordat het transport van glucose over de BHB trager verloopt, anderzijds doordat de opname en omzetting van glucose in de cellen versneld is.



## **8. Het effect van vasten op het ontstaan van celschade**

### **8.1. Inleiding**

In hoofdstuk 6 is gebleken, dat vasten beschermt tegen het ontstaan van irreversibele impedantiestijging in het repetitieve model. In welke mate er in het repetitieve model bescherming wordt geboden tegen cellulaire schade en voor welke hersengebieden dit geldt is nog niet bekend. In de literatuur werd slechts beschreven, dat na korte eenmalige ischemie celdood in de hippocampus wordt verminderd door vasten (Marie e.a., 1990).

In dit hoofdstuk is gebruik gemaakt van de zilverimpregnatie kleuring, omdat deze gevoelig, selectief en uitstekend geschikt is voor het kwantificeren van schade (zie hoofdstukken 2 en 4). Omdat er na tweemaalige hypoxie al vrij ernstige cellulaire schade ontstaat en na meer periodes de dieren vroegtijdig dood gingen, werd het effect van vasten op celschade na twee hypoxieperiodes onderzocht. Er is gekozen voor evaluatie van schade na 24 uur overleving, omdat de schade in o.a. het striatum zich daarna optimaal heeft ontwikkeld in controle dieren (Crain e.a., 1988 en zie hoofdstuk 4.3.2).

Na repetitieve hypoxie werd het spontane en geïnduceerde gedrag van de dieren geobserveerd en het overlevingspercentage genoteerd.

### **8.2. Materialen en methoden**

Aan alle ratten werd na eenzijdige occlusie van de arteria carotis twee maal hypoxie toegediend. Hieraan vooraf kreeg een groep van 6 ratten 24 uur geen voedsel maar wel water. Een groep van 4 ratten ontving vrijelijk voedsel en water.

Na 4 uur overleving werd de algemene indruk bepaald (ziek uitzien, rechtopstaande haren, beweging, eten en drinken) en werd gekeken of de dieren rondjes liepen, epileptische insulten vertoonden, reageerden op pijnprikkels en of er spontaan werd bewogen.

Na 24 uur werden de hersenen geperfundeerd met 4 % paraformaldehyde, waarna coupes werden gesneden en deze coupes gekleurd werden met de zilverimpregnatie methode. De hoeveelheid zilveropname werd gekwantificeerd en er werd gekeken in hoeverre de opname verschilde tussen gevaste dieren en controles. Zie hoofdstuk 2 voor specifiekere materialen en methoden.

### 8.3. Resultaten en commentaar

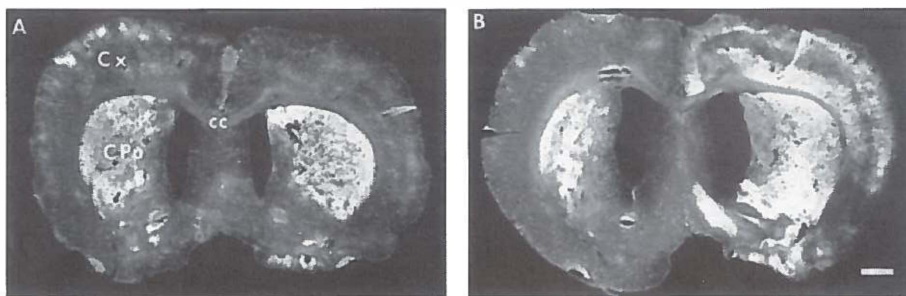
#### 8.3.1. Overleving en gedrag

Van de controles die vrijelijk toegang hadden tot voedsel, waren er 5 ratten van de 9 die 24 uur overleefden. Na 4 uur overleving (100 %) waren de controle dieren passief en zagen er ziek uit. Allen hadden recht opstaande haren, liepen met slepende poten, bewogen langzaam, en aten of dronken niet. Soms liepen ze rondjes (7 van de 9 ratten). Soms traden epileptische insulten op (5/9). Alle dieren reageerden op pijnprikkels en 6 van de 9 reageerden na oppakken en waren spontaan actief.

In de gevaste groep overleefden alle dieren gedurende 24 uur (7/7). De ratten waren actief direct na bijkomen van de operatie en zagen er niet ziek uit. Ze hadden geen recht opstaande haren, liepen normaal en aten en dronken gedurende de nacht. Soms liepen ze rondjes (3/7), maar er traden geen epileptische insulten op. Allen reageerden na 4 uur overleving op pijnprikkels, na oppakken en spontaan.

#### 8.3.2. Zilverimpregnatie kleuring

Na 24 uur recirculatie trad zilverimpregnatie op in de voor ischemie gevoelige gebieden (zie hoofdstuk 4). In gevasten was de schade in het striatum en de cortex aan de zijde van de carotis occlusie kleiner dan bij controles (zie figuur 8.1). Bij de controles omvat de schade het gehele ipsilaterale striatum, bij het gevaste dier vooral het gevoelige dorso-laterale gedeelte. Opvallend is de zeer geringe corticale zilver opname in gevaste dieren (figuur 8.1, tabel 8.1).



*Figuur 8.1. Overzicht van de zilverimpregnatie in (A) 24 uur gevasten en (B) controles (donkerveld opname). De hersenhelft ipsilateraal van de carotis occlusie is aan de rechterkant afgebeeld. Des te helderder de tint des te meer schade. Cx = cortex, CPu = caudato putamen, cc = corpus callosum. Doorsnede 0,2 mm frontaal van bregma. Balk = 1 mm.*

*Tabel 8.1. Zilveropname bij 24 uur gevaste en bij gevoede ratten na twee maal hypoxie-ischemie en 24 uur recirculatie. De zilveropname is op fotografisch negatief gemeten. Zie figuur 4.3. voor de ligging van de gebieden. A: sagittale doorsnede 0,2 mm frontaal van bregmapunt. B: sagittale doorsnede 3,3 mm caudaal, en C 5,8 mm caudaal van bregma. De gemiddelde waarden en SEM zijn aangegeven. Er is een significant verschil in impregnatie tussen de gevaste en de controle groep indien aangegeven met a  $p < 0,05$ , b  $p < 0,01$ , c  $p < 0,005$  of d  $p < 0,001$ .*

			CONTROLE (n=4)		GEVAST (n=6)	
			ipsilateraal	contralateraal	ipsilateraal	contralateraal
A	Cortex	mediaal opp.	1,84 ± 0,14	1,35 ± 0,12	0,96 ± 0,06 d	0,99 ± 0,08 a
		diep	1,65 ± 0,13	1,27 ± 0,10	0,99 ± 0,06 d	1,05 ± 0,06
	lateraal opp.		1,73 ± 0,10	1,34 ± 0,14	0,90 ± 0,05 d	1,00 ± 0,06 a
		diep	1,60 ± 0,13	1,46 ± 0,15	0,95 ± 0,05 d	1,03 ± 0,04 d
	Striatum	dorsolateraal	1,91 ± 0,09	1,53 ± 0,08	1,42 ± 0,11 b	1,39 ± 0,10
		ventromediaal	1,82 ± 0,14	1,48 ± 0,18	1,09 ± 0,07 d	1,08 ± 0,06 c
B	Cortex	mediaal opp.	1,55 ± 0,08	1,13 ± 0,07	0,97 ± 0,04 c	1,03 ± 0,07
		diep	1,43 ± 0,09	1,14 ± 0,21	1,03 ± 0,05 c	1,07 ± 0,07
		lateraal opp.	1,46 ± 0,15	1,11 ± 0,05	0,88 ± 0,07 c	1,01 ± 0,10
		diep	1,20 ± 0,09	1,06 ± 0,10	0,91 ± 0,06 a	1,10 ± 0,05
	Thalamus	lateraal	2,13 ± 0,17	1,23 ± 0,05	1,47 ± 0,07 c	1,17 ± 0,04
		mediaal	1,94 ± 0,14	1,18 ± 0,04	1,44 ± 0,05 c	1,17 ± 0,02
	Hippocampus	CA1	1,57 ± 0,19	1,19 ± 0,18	1,21 ± 0,10	1,12 ± 0,06
		CA2-3	1,18 ± 0,09	1,10 ± 0,13	1,09 ± 0,20	1,08 ± 0,06
		gyrus dentatus-CA4	1,47 ± 0,12	1,12 ± 0,15	1,13 ± 0,08	1,02 ± 0,08
C	Subst. Nigra reticulata		2,10 ± 0,08	1,32 ± 0,10	1,14 ± 0,06 c	1,14 ± 0,12

In de experimenten met gevaste dieren (n=6) en controles (n=4) is de hoeveelheid zilver in vele hersengebieden gemeten. De gemiddelde waarden staan in tabel 8.1 met vermelding van de variatie (SEM) en statistische significantie van de verschillen. Er valt op dat in alle gebieden in de ipsilaterale hemisfeer en sommige corticale gebieden in de contralaterale hemisfeer de zilver opname in de gevaste groep veel lager was dan bij controles. De opname in de ipsilaterale hersenhelft was na vasten significant lager dan bij controles in de frontale cortex (0,90-0,99 versus 1,60-1,84) in de caudale cortex (0,88-1,03 versus 1,20-1,55), in het striatum (1,09-1,42 versus 1,82-1,91), in de thalamus (1,44-1,47 versus 1,94-2,13) en de substantie nigra (1,14 versus 2,10).

Na vasten was de opname in alle corticale gebieden, het ventromediale striatum en de substantia nigra niet verhoogd boven de normaalwaarde (1). Vasten gaf dus volledige bescherming van deze gebieden. Met name de bescherming van de oppervlakkige cortex en de substantia nigra is opvallend, omdat deze gebieden extreem gevoelig zijn voor schade (zie hoofdstuk 4). Het dorsolateraal striatum en laterale thalamus zijn eveneens zeer gevoelig maar hier was de bescherming partieel.

Er zijn geen duidelijke verschillen in bloeddorstrooming tussen volledig- (bijv. cortex) en onvolledig- (bijv. striatum) beschermde gebieden (Ginsberg e.a., 1976). Wel kan de cortex in sterkere mate dan het striatum overschakelen op de verbranding van ketonlichamen (Hawkins en Biebuyck, 1979) en mogelijk daardoor vitaal blijven. De hoeveelheid ketonlichamen in het bloed ( $\beta$ -OH-butyraat, hoofdstuk 6) wordt door vasten verhoogd.

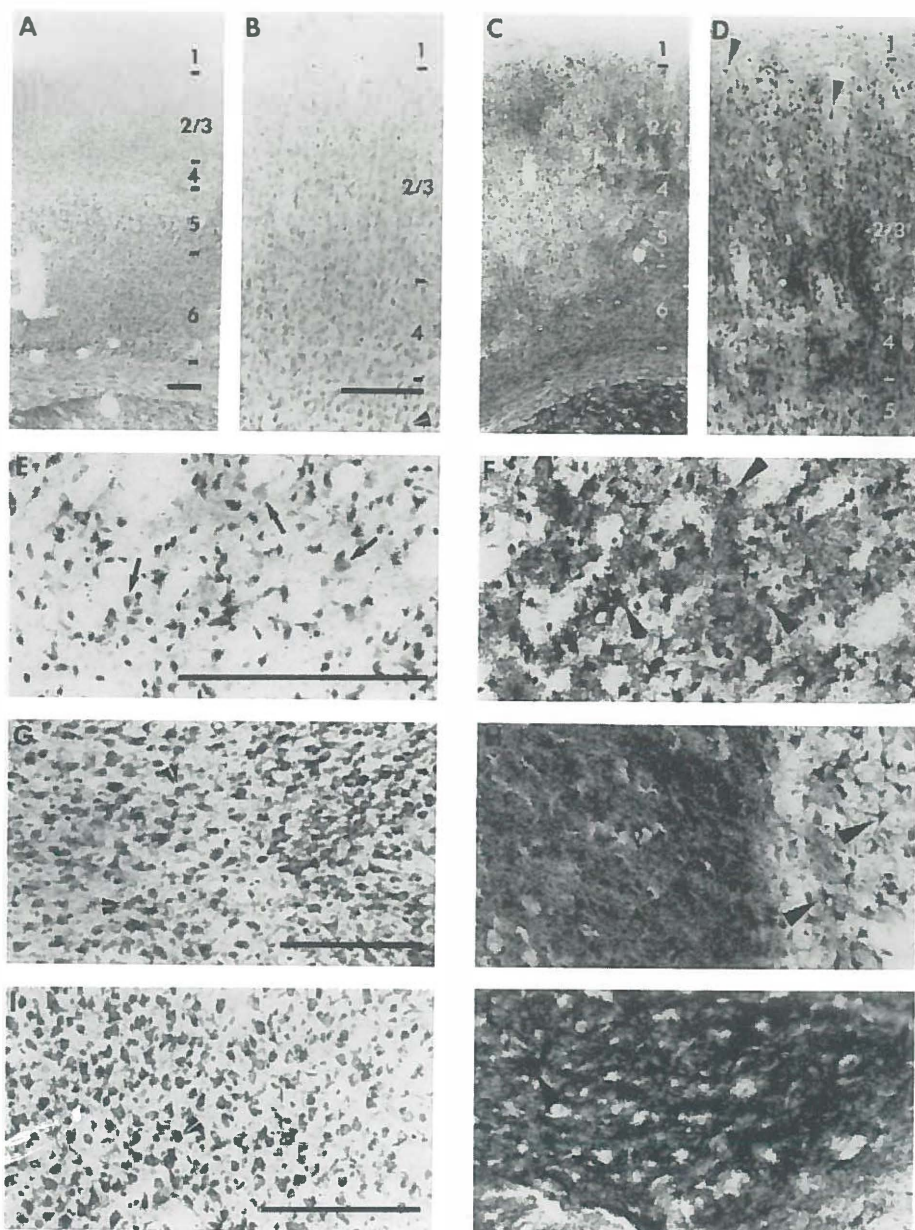
Bij de schade aan de substantia nigra pars reticulata speelt de omzetting van glucose in melkzuur een belangrijke rol (Inamura e.a., 1988). Na vasten is glucose in het bloed verlaagd en hierdoor werd mogelijkwerwijs de aan melkzuurvorming gerelateerde schade verminderd.

De veranderingen van de zilver opname op cellulair niveau worden getoond in figuur 8.2. Bij controles strekt de schade zich uit over bijna alle neuronen in de gehele diepte van de cortex, striatum, thalamus en substantia nigra. Bovendien zijn veel beschadigde zenuw-eindigingen afgebeeld als gruis tussen de neuronen (zie figuur 8.2).

Bij gevaste dieren zijn in de genoemde structuren geringe aantallen beschadigde neuronen te herkennen. In de cortex laag 3 zijn nauwelijks beschadigde neuronen te vinden, en weinig schade van eindplaatjes (figuur 8.2.B). In het dorsolaterale striatum treedt degeneratie op in ongeveer de helft van de neuronen i.t.t. volledige degeneratie bij controles (figuur 8.2.E en F). Er is ook nauwelijks degeneratie van eindigingen. De schade in de thalamus is na vasten eveneens gering (figuur 8.2.G), er is echter wel degeneratie van eindplaatjes en neerslag van een enkele zilverkorrel in neuronen te zien. Dit verklaart de in tabel 8.1 gevonden relatief hoge zilveropname in de thalamus. In de substantia nigra is niet of nauwelijks schade van neuronen en eindplaatjes te zien (figuur 8.2.I). De eindplaatjes zijn onderdeel van het ventromediale striatum (globus pallidus) dat eveneens onbeschadigd was (tabel 8.1).

#### **8.4. Conclusies**

Vasten voorkomt morbiditeit en mortaliteit, die zou optreden binnen 24 uur na hypoxie-ischemie. Vasten voorkomt de schade aan neuronen en eindplaatjes van vele belangrijke hersengebieden. Neuronen in het gevoelige gedeelte van het striatum en de thalamus worden gedeeltelijk beschermd, de gevoelige corticale gebieden en de substantia nigra worden volledig beschermd. De laatstgenoemde structuren hebben meer baat bij vasten. Een verhoogde omzetting van ketonlichamen en/of een verminderde vorming van melkzuur kunnen voor de additionele bescherming verantwoordelijk zijn.



**Figuur 8.2.** Neuronale schade 24 uur na twee maal hypoxie-ischemie. Linker deelfiguren (A,B,E,G,I) 24 uur gevaste, rechts (C,D,F,H,J) controle. Intacte cellen (pijl) zijn licht gekleurd, beschadigde neuronen zwart (driehoek). Soms is er een neerslag van een zilverkorrel in een verder normaal neuron (dubbele driehoek). A en C: frontale cortex, B en D: alleen oppervlakkige lagen hiervan. De lagen zijn genummerd volgens Zilles (1985). E en F: dorsolateraal striatum. G en H: ventrobasale thalamus. I en J: Substantia nigra reticulata. Balk = 200  $\mu$ m.





## 9. Discussie

In dit proefschrift zijn voor het eerst de effecten van repetitieve hypoxie-ischemie op het striatale impedantieverloop beschreven. Het bleek, dat na een reproduceerbaar aantal periodes van reversibele impedantieverandering (IV) een toestand van irreversibele IV was te induceren. Branston e.a. (1978) en Hossmann (1971) hebben dit fenomeen eerder beschreven als toevalsbevinding bij eenmalige ischemie, maar hebben de mogelijk voorspellende waarde voor hersenpathologie niet onderzocht. Uit onze experimenten blijkt, dat irreversibele IV een voorbode is van ernstige en acute (histo)pathologische veranderingen. Na 3-4 uur recirculatie was het extracellulaire volume (ECV) minimaal, waren de gradiënten van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  over de celmembraan verstoord en was er massale neuronale necrose in het striatum, cortex en thalamus opgetreden.

Necrose van gliacellen kon histologisch niet direct worden aangetoond. Toch is de gliafunctie waarschijnlijk gestoord in de periode van irreversibele IV. Enerzijds, omdat m.n. gliacellen verantwoordelijk zijn voor het normaliseren van celvolume en gradiënten van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  (Hertz, 1981), en anderzijds omdat het ECV alleen minimaal kan zijn als naast neuronen ook gliacellen gezwollen zijn. Het ontstaan van schade aan gliacellen kon bovendien indirect worden aangetoond met de H-E kleuring en met zilverimpregnatie (Zie hoofdstuk 4). Na een permanente vaatafsluiting werden uitsluitend irreversibele veranderingen van de gradiënten voor  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  geobserveerd in het centrale, zich tot infarct ontwikkelende gebied en niet in de periferie (Schuier en Hossmann, 1980). Samenvattend, de aard, ernst en het acute optreden van de (histo)pathologische veranderingen duiden er alle op, dat de schade na irreversibele IV het karakter heeft van een infarct (pannecrose van neuronale en glia-elementen).

De ernst van de daling van het ECV tijdens repetitieve hypoxie is vergelijkbaar tussen de opeenvolgende periodes, het herstel van het ECV echter niet. Er is aanvankelijk volledig herstel, daarna gedeeltelijk herstel en uiteindelijk geen herstel maar verslechtering van het ECV (Hoofdstuk 4). Dit fenomeen werd waargenomen bij een normoxieperiode van 10 min en niet na 30 min normoxie, waarbij volledige normalisering optrad (Klein e.a. 1990). Verlenging van de herstelperiode beschermt dus tegen irreversibele IV (=ECV daling) bij gelijkblijvende ernst van de hypoxische episodes. Bij deze aard van bescherming spelen mogelijk die factoren een rol, die na langere normoxieduur (30 min) in sterkere mate herstellen dan na 10 min normoxie. Hiervoor komen in aanmerking: Lactacidose, intracellulaire ophoping van  $\text{Ca}^{2+}$ , NADH, ATP, daling van extracellulair  $\text{Ca}^{2+}$  en extracellulaire verhoging van neurotransmitters (glutamaat, dopami-

ne e.a.). Onduidelijk is de rol van cerebrale glucoseopname en doorbloeding, aangezien deze initieel verhoogd zijn (  $\pm 5$  min recirculatie) en later (  $> 30$  min recirculatie) progressief dalen (Pulsinelli e.a., 1982<sup>b</sup>, Tomida e.a., 1987).

Yamaguchi observeerde in 1986, dat extracellulair  $\text{Ca}^{2+}$  veel later normaliseerde dan de impedantie, en het daaruit berekende ECV. Ook de normalisatie van intracellulair lactaat (Gardiner e.a. 1982), extracellulair lactaat (Klein e.a. 1989) en intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$  (Uematsu e.a., 1988) is traag in vergelijking met het ECV. Lactaat en  $\text{Ca}^{2+}$  zijn na één hypoxie en normoxieperiode dus nog steeds verhoogd en stijgen mogelijk na elke hypoxieperiode verder totdat er een niveau wordt bereikt dat het herstel van het ECV belemmert en acute schade veroorzaakt. Een hoog intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$  niveau is schadelijk door secundaire activatie van o.a. fosfolipasen met als gevolg destructie van membranen en essentiële enzymen, en lactaat is schadelijk via inhibitie van essentiële enzymen door acidose (Siesjö en Bengtsson, 1990). De normalisatie van extracellulaire neurotransmitters lijkt in tijdsverloop op die van het ECV (Globus e.a., 1988) en is mogelijk afhankelijk van dezelfde (beschadigende) processen. De recente observatie dat extracellulair glutamaat na repetitieve hypoxie irreversibel stijgt bevestigt deze hypothese (Lin e.a. 1991).

Er is onderzocht of irreversibiliteit kon worden voorkomen door ingrepen op ion-stromen, neurotransmissie, cerebrale hypoperfusie, vrije radicaal vorming, verandering van hersentemperatuur en glucosemetabolisme. Bij alle ingrepen waren de veranderingen van het ECV niet fundamenteel verschillend van controles. D.w.z. de ernst van de hypoxische episodes lijkt niet te verschillen. Daarentegen is het uiteindelijke herstel sterk verschillend. In de vorige alinea is genoemd, dat het verlengen van de herstelperiode het herstel bevordert. Er is bij de effectief gebleken ingrepen op bovengenoemde processen waarschijnlijk sprake van een versneld herstel binnen de vaste normoxieperiode van 10 min. In de volgende alinea's wordt het herstel bevorderende effect van de ingrepen gerelateerd aan hun effecten op ion gradiënten, neurotransmissie en (glucose) metabolisme.

Recente experimenten met hersenkoeling hebben het inzicht in de beschermende werking van hypothermie vergroot. Bij koeling van de hersenen tot  $34\text{--}35^\circ\text{C}$  verschilt de ischemische depletie van ATP en ophoping van lactaat vrijwel niet met normothermie (Busto e.a., 1987; Natale e.a., 1989) en kan de bescherming niet worden gerelateerd aan het metabolisme tijdens ischemie. Daarentegen is er tijdens recirculatie een verhoging van de glucoseopname in geactiveerde en niet geactiveerde hersengebieden gevonden (Ginsberg e.a. 1989; Dietrich e.a. 1991). Dit gaat waarschijnlijk niet gepaard met veranderde lactaat vorming (Natale e.a. 1989). Cardell e.a. observeerden in 1991 na hypothermie een verminderde postischemische daling van protein kinase C (PKC). Activatie van het PKC

signaal transductie systeem verhoogt de glucoseopname (Mudd e.a., 1990). Het is dus mogelijk, dat de verhoging van het postischemisch glucosemetabolisme via het PKC systeem plaatsvindt. Er is tijdens hypothermie een verminderde uitstoot van glutamaat en dopamine (Busto e.a., 1989) en verlaagde cellulaire accumulatie van  $\text{Ca}^{2+}$  (Araki e.a. 1991) geobserveerd. Bovendien normaliseren de concentraties sneller na recirculatie. De bevindingen geven aan, dat hypothermie beschermt door invloed op postischemische ionstromen, neurotransmissie, en glucosemetabolisme.

In dit proefschrift is het beschermende effect van vasten voor het eerst goed gedocumenteerd. Het effect van vasten op (extra)cellulair volume, glucose metabolisme, overleving en histologie is niet eerder in één model onderzocht. Dat glucose toediening een negatief effect heeft op al deze parameters was al bekend (zie hoofdstuk 1.4). Het was nog niet aangetoond, dat een verlaging van bloedglucose door vasten duidelijke positieve effecten kon hebben. Na vasten was de glucoseconcentratie in rust iets lager dan bij controles, en tijdens hypoxie beduidend lager. Aangezien tijdens hypoxie-ischemie de extractie van glucose uit het bloed maximaal is, zal er door het vasten minder glucose in de hersenen worden opgenomen. Vasten voorkwam irreversibele celzwellen en het daaraan gerelateerde infarct. Bij het voorkomen van het infarct kan de verminderde omzetting van glucose tot melkzuur een belangrijke rol spelen (Gardiner e.a., 1982, Combs e.a., 1990).

Vasten voorkwam bovendien selectieve neuronale schade, mortaliteit en morbiditeit na een mildere episode (2 maal hypoxie-ischemie met reversibele IV). Opvallend was, dat zeer gevoelige corticale gebieden niet beschadigd werden (en striatale gebieden wel). Hiervoor was waarschijnlijk de corticaal (i. t. t. striataal) verhoogde omzetting van ketonlichamen verantwoordelijk (zie hoofdstuk 8). Ook bij het voorkomen van selectieve neuronale necrose kan het hersenmetabolisme dus een rol spelen.

De beperking van de meeste studies naar de effecten van vasten is, dat de glucose opname gemeten is in rust en niet tijdens ischemie. Het effect van vasten op de cerebrale glucose opname in rust is gering (Pardridge en Oldendorf, 1975; Mans e.a, 1987; Ruderman e.a., 1974). Tijdens repetitieve hypoxie-ischemie waren echter duidelijke veranderingen te zien van extracellulair glucose in het striatum. Na een aantal periodes hypoxie-ischemie werd de extracellulaire glucoseconcentratie zeer laag, ook tijdens normoxie-recirculatie. Deze daling ging niet samen met eenzelfde verlaging van glucose in het bloed en duidt er dus op, dat het wordt veroorzaakt door cerebrale processen. Er is sprake van een vertraagde aanvoer van glucose vanuit het bloed naar de extracellulaire ruimte, of een verhoogde afvoer van glucose naar het intracellulaire compartiment.

Er zijn een aantal aanwijzingen, dat de cellulaire opname van glucose is verhoogd na

vasten. Na vasten verlaagt minder glucose de hersenen via het veneuze systeem bij gelijkblijvend inwaarts transport over de BHB (Pardridge en Oldendorf, 1975). Na vasten is Glucose-1,6-difosfaat intracellulair verlaagd en hierdoor wordt de omzetting van glucose door hexokinase gestimuleerd (Beitner, 1990). De glucose transporter verplaatst zich naar de celmembraan (Widnell e.a. 1990), de concentratie van mRNA voor de HepG2 glucosetransporter stijgt en door deze veranderingen neemt de glucoseopname in m.n. gliacellen toe (Walker e.a. 1988).

Tijdens de reversibele periodes was de mate van herstel van het ECV niet verschillend tussen gevasten en controles (Hoofdstuk 6). Indien de postischemische glucoseopname verhoogd is, wordt dit blijkbaar niet aangewend voor een versneld herstel van electrolytgradiënten. Dit is in overeenstemming met onderzoek naar ischemische hersenplakjes, waarbij het herstel van extracellulair  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$  en EEG onafhankelijk was van glucose (Bock e.a., 1989). Mogelijk voorkomt het postischemisch verhoogde glucosemetabolisme irreversibele celzwellen en celschade door het versnellen van andere meer essentiële herstelprocessen. Hierbij is het mogelijk van belang, dat onder invloed van hypoglycemie GRP's (glucose regulated proteins, uit de heat shock protein familie) vrijkomen (Hightower, 1991), die destructie van essentiële eiwitten voorkomen o.a. als gevolg van ischemie (Matsumoto e.a. 1991).

Het is bovendien mogelijk, dat het transport van glucose vanuit het bloed was vermindert na vasten. De aanvoer van glucose naar de extracellulaire ruimte kan enerzijds bemoeilijkt worden door verminderde cerebrale doorbloeding (CBF) en anderzijds door effecten op het transport over de BHB. De bloeddruk was na enkele hypoxieperiodes lager bij gevaste dieren dan bij controles en daardoor kan de CBF lager worden (vergelijk Salford en Siesjö, 1974 en Gardiner e.a., 1982). De daling van glucose in het bloed trad alleen na de derde hypoxie op, terwijl de verlaging van extracellulair glucose al vanaf de tweede hypoxie significant is. Het is daarom onwaarschijnlijk, dat de verandering van de bloeddruk een verminderde aanvoer van glucose veroorzaakt heeft. In rust wordt het transport van glucose over de BHB niet beïnvloed door vasten (Pardridge en Oldendorf, 1975). Toch kan het niet worden uitgesloten dat vasten gedurende repetitieve hypoxie-ischemie het transport van glucose over de BHB belemmert.

De effecten van insuline en vasten op bloedglucose komen in hoge mate overeen en kunnen de bescherming tegen irreversibele IV gedeeltelijk verklaren. Er zijn daarnaast specifieke verschillen tussen vasten en insuline toediening, welke het beloop mede kunnen bepalen. Na vasten is de concentratie van ketonlichamen verhoogd, welke postischemisch kunnen worden geoxideerd (Kirsch en D'Alecy, 1984) en mogelijk daardoor een additieve bescherming geven (Go e.a. 1988). Daarentegen daalt de concentratie van ketonlichamen

door insuline. Een ander voordeel van vasten kan het optreden van geringe hersen-hypothermie zijn (hoofdstuk 6). Na vasten is de insulinespiegel laag (Strubbe en Alingh-Prins, 1986), een mogelijk nadeel t.o.v insuline injectie aangezien insuline celnecrose kan voorkomen onafhankelijk van de glucoseconcentratie (Auer en Voll, 1991). Om al deze redenen kunnen vasten en insuline niet als beschermingsmechanismen worden gezien die op uitsluitend dezelfde mechanismen berusten.

De ingrepen op neurotransmissie, ion-stromen, vrije radicaal vorming en hypoperfusie waren geen van alle effectief beschermend in het repetitieve model. Mogelijk is de hoge selectiviteit van de ingrepen hier debet aan. MK-801 blokkeert één subtype van de glutamaat receptor, Nimodipine één subtype van het  $\text{Ca}^{2+}$  kanaal, allopurinol en indomethacine blokkeren wel de cycloöxygenase en niet de lipoöxygenase route voor vorming van vrije radicalen en ketanserine heft uitsluitend hypoperfusie op door het blokkeren van serotonine receptoren. Het in de literatuur beschreven positieve effect van elk van deze stoffen geldt voor relatief milde modellen (met kortdurende of geringe daling van de CBF) en gaat dus niet noodzakelijkerwijs op voor ernstigere modellen (Warner e.a., 1991). Bovendien is niet altijd gevalideerd, dat secundaire afkoeling van de hersenen optreedt. Dit kan het beschermende effect van bijvoorbeeld MK-801 in een model van globale ischemie volledig verklaren (Buchan en Pulsinelli, 1990).

In de klinische situatie is het CVA een duidelijke stress voor de patiënt. De catabole hormonen noradrenaline, adrenaline en cortisol gaan omhoog (Feibel e.a., 1977), cortisol suppressie wordt moeilijker (Gertler e.a., 1975), er treedt insuline resistentie op (Feibel e.a., 1977) en er ontstaat door deze hormonale veranderingen hyperglycemie (Weissman, 1990). De respons is zeer variabel. Een lagere respons van catabole hormonen (Feibel e.a., 1977; Olsson e.a, 1989) en glucose (Woo e.a, 1988; Kushner e.a., 1990) gaat samen met minder mortaliteit en morbiditeit van patiënten.

De rol van glucose en hormonen bij ischemische schade wordt in dit proefschrift bevestigd en gespecificeerd. De toestand vlak voor de ischemische episode bleek zeer belangrijk voor de veranderingen tijdens de episode en de schade na de episode. Geringe hypoglycemie voordat het CVA ontstaat, is onder meer gunstig, omdat daarmee de hyperglycemische respons tijdens ischemie wordt voorkomen. Het is waarschijnlijk dat ischemie ook na behandeling (met insuline of vasten) gepaard gaat met uitstoot van catabole hormonen, welke dan minder effect hebben op de glucosespiegel. Het herstel van een patiënt na het CVA is dus sterk afhankelijk van de voedingstoestand en de hormonale balans, vlak voordat het CVA ontstaat.

Irreversibele impedantiestijging in de acute recirculatiefase bleek een goede methode om een infarct vroeg te onderkennen. Dit instrument ontbreekt in het klinisch onderzoek. Er is sinds kort een methode om met  $^{23}\text{Na}$ -NMR spectroscopie verplaatsing van Natrium ionen aan te tonen in vivo (Naritomi e.a., 1988; Pekar e.a., 1991). Daarnaast is het mogelijk om m.b.v. het EEG te bepalen of er ischemische depolarisatie optreedt (Takanashi e.a., 1991). Op deze manier kunnen in gebieden met recirculatie (te visualiseren met  $^{15}\text{O}$ -PET of Doppler stroom meting) irreversibele verschuivingen van ionen worden bepaald. In dit geval zijn deze methoden geschikt om bij patiënten op een niet invasieve manier irreversibele celschade vroeg aan te tonen.

Concluderend, De ernst van de ischemische schade kan na een korte recirculatieperiode met het impedantieverloop worden voorspeld. Irreversibel verloop voorspelt verandering van  $\text{Na}^+$  en  $\text{K}^+$  gradiënten, infarct in het striatum en schade aan de cortex en de thalamus. Het repetitieve model bleek geschikt te zijn om beschermingsmaatregelen te screenen. Ingrepen op ion-stromen, receptoren, cerebrale doorbloeding en vrije radicaalvorming waren ineffectief, mogelijk op grond van té selectief werkingsmechanisme. Ingrepen op cellulair metabolisme waren soms effectief. Cerebrale hypothermie beschermt mogelijk door versnelde postischemische normalisering van het glucose metabolisme, extracellulair glutamaat en intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$ . Vasten kan schade voorkomen door verlaagde omzetting van glucose tot lactaat en verhoogd postischemisch aëroob metabolisme van glucose en ketonlichamen. Insuline beschermt mogelijk door directe effecten op neuronen en indirecte effecten door de verlaagde bloedglucose.

Het beschreven dierexperimentele werk heeft implicaties voor de klinische situatie. Bij CVA patiënten is het raadzaam hyperglycemie tijdens ischemie te voorkomen. Of geringe hypoglycemie schade door een CVA kan voorkomen, dient in een goed gecontroleerde klinische studie te worden onderzocht.

## 10. Lijst met afkortingen

ABD:	Gemiddelde arteriële bloeddruk
ACM:	Arteria cerebri media
ADP:	Adenosine difosfaat
ATP:	Adenosine trifosfaat
BHB:	Bloed-hersen barrière
CBF:	Cerebrale doorbloedingssnelheid
CI:	Change of the impedance
CVA:	Cerebrovasculair accident
ECV:	Extracellulaire volume
EEG:	Electroëncefalogram
GABA:	Gamma-amino-boterzuur
i.p.:	Intraperitoneaal
i.v.:	Intraveneus
IV:	Impedantie verandering
NAD:	Nicotinamide adenine dinucleotide (geoxideerd)
NADH:	Nicotinamide adenine dinucleotide (gereduceerd)
NADPH:	Nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat (gereduceerd)
PET:	Positron emissie tomografie
PKC:	Proteïne kinase C (intracellulair signaal transductie systeem)
RAK:	Receptor afhankelijk kanaal
SEM:	Standaard afwijking van het gemiddelde
TIA:	Tijdelijke ischemie (Transient ischemic attack)
VAK:	Voltage afhankelijk kanaal





## 11. Literatuur

- Abe K, Araki T en Kogure K (1988) Recovery from edema and of protein synthesis differs between the cortex and caudate following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Neurochem* 51:1470-1476
- Aladjalova VA (1964) Slow electrical processes in the brain. *Progress Brain Res* 7:156-206
- Araki N, Greenberg JH, Sladky JT en Reivich M (1991) Effect of mild hypothermia on the changes of intracellular calcium in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S843
- Astrup J, Siesjö BK en Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - The ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725
- Auer RN en Voll CL (1991) Insulin reduces ischemic brain damage by a direct CNS effect. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: S760
- Auer RN en Siesjö BK (1988) Biological differences between ischemia hypoglycemia and epilepsy. *Ann Neurol* 24:699-707
- Beitner R (1990) Regulation of carbohydrate metabolism by glucose 1,6-bisphosphate in extrahepatic tissues: Comparison with fructose 2,6-bisphosphate. *Int J Biochem* 22:553-557
- Benveniste H, Jörgensen MB, Diemer NH en Hansen AJ (1988) Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. *Acta Neurol Scand* 78:529-536
- Berger L en Hakim AM (1986) The association of hyperglycemia with cerebral edema in stroke. *Stroke* 17:865-871
- Berntmann L, Welsh FA en Harp JR (1981) Cerebral protective effect of low grade hypothermia. *Anesthesiology* 55:495-498
- Betz AL, Ennis SR, Schielke GP en Hoff JT (1990) Blood-to-brain sodium transport in ischemic brain edema. *Advances Neurol* 52:73-80
- Billir J, Love BB, Marsh E, Jones MP, Knepper LE, Jiang DA, Adams HP en Gordon DL (1990) Spontaneous improvement after acute ischemic stroke. A pilot study. *Stroke* 21:1008-1012
- Bock AC, Scheller D, Tegtmeier F, Hansen AJ, Dengler K, Zacharias E en Höller M (1989) Postischemic recovery of electrophysiological function and extracellular pH during normo- and aglycemic reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:S642
- Bogousslavsky J en Regli F (1984) Cerebral infarction with transient signs (CITS): Do TIAs correspond to small Deep infarcts in internal carotid artery occlusion? *Stroke* 15:536-539
- Branston NM, Symon L en Strong AJ (1978) Reversibility of ischaemically induced changes in extracellular potassium in primate cortex. *J Neurol Sci* 37:37-49
- Branston NM, Strong AJ en Symon L (1982) Kinetics of resolution of transient increases in extracellular potassium activity: Relationships to regional blood flow in primate cortex. *Neurol Res* 4:1-19
- Brierly, JB (1976) Cerebral hypoxia. Pag. 43-85 uit: Greenfield's Neuropathology. Blackwood W,

Corsellis JAN, redactie. Edward Arnold, London

Brooks SPJ en Storey KB (1988) Anoxic brain function: molecular mechanisms of metabolic depression. *FEBS Letters* 232:214-216

Brown AW en Brierley JB (1972) Anoxic-ischemic cell change in rat brain. Light microscopic and fine-structural observations. *J Neurol Sci* 16:59-84

Buchan A en Pulsinelli WA (1990) Hypothermia but not the N-Methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci* 10:311-316

Busto R, Dietrich WD, Globus MYT, Valdés I, Scheinberg P en Ginsberg MD (1987) Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Stroke* 18:729-738

Busto R, Globus MYT, Dietrich WD, Martinez E, Valdés I en Ginsberg MD (1989) Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20:904-910

Carlsson C, Hägerdal M en Siesjö BK (1976) Protective effect of hypothermia in cerebral oxygen deficiency caused by arterial hypoxia. *Anesthesiology* 44:27-35

Cardell M, Wieloch T en Boris-Möller F (1991) Changes in the activity and subcellular distribution of protein kinase C subspecies during and following cerebral ischemia in the rat. Effect of hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S845

Chih CP, Feng ZC, Rosenthal M, Lutz PL en Sick TJ (1989) Energy metabolism, ion homeostasis, and evoked potentials in anoxic turtle brain. *Am J Physiol* 257:R854-R860

Choi DW (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58:293-297

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379

Choi DW (1990) Cerebral hypoxia: Some approaches and unanswered questions. *J Neurosci* 10:2493-2501

Chopp M, Chen H, Dereski MO en Garcia JH (1991) Mild hypothermic intervention after graded ischemic stress in rats. *Stroke* 22:37-43

Church J, Zeman S en Lodge D (1988) The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* 69:702-709

Collewijn H en Schadé JP (1964) Chloride, potassium and water content of apical dendrites and their changes after circulatory arrest, at body temperatures from 37 °C to 20 °C. *Arch Internat Physiol Biochim* 72:194-210

Combs DJ, Dempsey RJ, Maley M, Donaldson D en Smith C (1990) Relation between plasma glucose, brain lactate, and intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 21:936-942

Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH en Nadler JV (1988) Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: A silver impregnation study. *Neuroscience* 27:387-402

- Crawford RMM (1978) Biochemical and ecological similarities in marsh plants and diving animals. *Naturwissenschaften* 65:194-201
- Crowell RM, Marcoux FW en DeGirolami U (1981) Variability and reversibility of focal cerebral ischemia in unanesthetized monkeys. *Neurology* 31:1295-1302
- Daniel PM, Love ER, en Pratt OE (1975) Insulin and the way the brain handles glucose. *J Neurochem* 25:471-476
- Dávalos A, Cendra E, Teruel J, Martinez M en Genfs D (1990) Deteriorating ischemic stroke: Risk factors and prognosis. *Neurology* 40:1865-1869
- De Boer J, Klein HC, Postema F, Go KG en Korf J (1989) Rat striatal cation shifts can be predicted by on-line impedance measurements. *Stroke* 20:1377-1382
- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD en Seligman ML (1980) The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand* 492:91-119
- Dienel GA (1984) Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* 43:913-925
- Dietrich WD, Busto R en Ginsberg MD (1989) Effect of the serotonin antagonist ketanserin on the hemodynamic and morphological consequences of thrombotic infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:812-820
- Dietrich WD, Busto R, Alonso O, Pita-Loor Y, Globus MYT en Ginsberg MD (1991) Intracerebral ischemic brain hypothermia promotes postischemic metabolic recovery and somatosensory activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S846
- Doll CJ, Hochachka PW en Reiner PB (1991) Effects of anoxia and metabolic arrest on turtle and rat cortical neurons. *Am J Physiol* 260:R747-R755
- Dross K en Kewitz H (1972) Concentration and origin of choline in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 274:91-106
- Else PL en Hulbert AJ (1987) Evolution of mammalian endothermic metabolism: "leaky" membranes as a source of heat. *Am J Physiol* 253:R1-R7
- Feibel JH, Hardy PM, Campbell RG, Goldstein MN en Joynt RJ (1977) Prognostic value of the stress response following stroke. *JAMA* 238:1374-1376
- Fields WS en Lemack NA (1989) A history of stroke. Its recognition and treatment. Oxford university press, New York, Oxford
- Fieschi C, Mariani F, Brambilla GL, Prencipe M, Tomassello F, Argentino C, Bono G, Candelise L, De Zanche L, Inzitari D en Nardini M (1983) Italian multicenter study on reversible cerebral ischemic attacks: population characteristics and methodology. *Stroke* 14:424-430
- Fisher CM (1987) Concerning transient ischemic attacks. *Cleve Clin J Med* 54:3-11

- Gallyas F, Wolff JR, Böttcher H en Zaborzky L (1980) A reliable and sensitive method to localize terminal degeneration and lysosomes in the central nervous system. *Stain Technology* 55:299-306
- Gardiner M, Smith ML, Kågström E, Shohami E en Siesjö BK (1982) Influence of blood glucose concentration on brain lactate accumulation during severe hypoxia and subsequent recovery of energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2:429-438
- Gercken G en Preuss H (1969) The effect of breathing oxygen on the metabolism of the rat brain under normal and ischaemic conditions. *J Neurochem* 16:761-767
- Gerfen CR (1988) Synaptic organization of the striatum. *J Electron Microsc Technique* 10:265-281
- Germano IM, Bartkowski HM, Cassel ME en Pitts LH (1987) The therapeutic value of nimodipine in experimental focal cerebral ischemia. Neurological outcome and histopathological findings. *J Neurosurg* 67:81-87
- Gertler MM, Leetma HE, Koutrouby RJ en Johnson ED (1975) The assessment of insulin, glucose and lipids in ischemic thrombotic cerebrovascular disease. *Stroke* 6:77-84
- Giffard RG, Monyer H, Christine CW en Choi DW (1990) Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* 506:339-342
- Gill R, Foster AC en Woodruff GN (1988) MK-801 is neuroprotective in gerbils when administered in the post-ischaemic period. *Neuroscience* 25:847-855
- Ginsberg MD en Busto R (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20:1627-1642
- Ginsberg MD, Medoff R en Reivich M (1976) Heterogeneities of regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in the rat. *Stroke* 7:132-134
- Ginsberg MD, Welsh FA en Budd WW (1980) Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. I. Local cerebral blood flow and glucose utilization. *Stroke* 11:347-354
- Ginsberg MD, Busto R, Castella Y, Valdés I en Llor J (1989) The protective effect of moderate intra-ischemic brain hypothermia is associated with improved postischemic glucose utilization and blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:S380
- Globus MYT, Ginsberg MD, Dietrich WD, Busto R en Scheinberg P (1987) Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in striatum. *Neurosci Lett* 80:251-256
- Globus MYT, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdés I en Ginsberg MD (1988) Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and  $\gamma$ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 51:1455-1464
- Globus MYT, Busto R, Martinez E, Valdés I en Dietrich WDD (1990) Ischemia induces release of glutamate in regions spared from histopathologic damage in the rat. *Stroke* 21:III-43—III-46
- Go KG, Prenen GHM en Korf J (1988) Protective effect of fasting upon cerebral hypoxic-ischemic damage. *Metab Brain Disease* 3:257-263
- Goldman SA, Pulsinelli WA, Clarke WY, Kraig RP en Plum F (1989) The effects of extracellular acidosis on neurons and glia in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:471-477
- Greer M (1982) Strategies for reducing stroke frequency. *Geriatrics* 37:36-42

- Grisar T, Franck G en Schoffeniels E (1978)  $K^+$ -activation mechanisms of the  $(Na^+, K^+)$ -ATPase of bulk-isolated glia and neurons. Pag. 359-369 uit *Dynamic properties of glia cells*. Redactie: Schoffeniels E, Franck G, Hertz L en Tower DB. Oxford, Pergamon press.
- Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, en Sandberg M (1987) Extracellular adenosine inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem* 49:227-231
- Hakim AM (1987) The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sci* 14:557-559
- Hansen AJ (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65:101-147
- Hansen AJ en Olsen CE (1980) Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand* 108:355-365
- Hansen AJ en Zeuthen T (1981) Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 113:437-445
- Harper GD en Castleden CM (1990) Drug therapy in patients with recent stroke. *Brit Med Bull* 46:181-201
- Harris RJ en Symon L (1984) Extracellular pH, potassium, and calcium activities in progressive ischaemia of rat cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:178-186
- Hawkins RA en Biebuyck JF (1979) Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 205:325-327
- Heffez DS en Passonneau JV (1985) Effect of Nimodipine on cerebral metabolism during ischemia and recirculation in the mongolian gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:523-528
- Heimer L en Peters A (1968) An electron microscope study of silver stain for degenerating boutons. *Brain Res* 8:337-346
- Hertz L (1981) Features of astrocytic function apparently involved in the response of central nervous tissue to ischemia-hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:143-153
- Hightower LE (1991) Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66:191-197
- Hochachka PW en Mommsen TP (1983) Protons and anaerobiosis. *Science* 219:1391-1397
- Hoffmann WE, Brauchner E, Pelligrino DA, Thomas C, Albrecht RF en Miletich DJ (1990) Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose loaded rats. *Anesthesiology* 72:1045-1050
- Holzgraefe M en Wolff JR (1977) A device for dark field photography at low magnifications. *J Microscopy* 111:225-227
- Hossmann KA (1971) Cortical steady potential, impedance and excitability changes during and after total ischemia of cat brain. *Exp Neurol* 32:163-175
- Hossmann KA (1985) Post-ischemic resuscitation of the brain: selective vulnerability versus global resistance. *Progr Brain Res* 63:3-17
- Hossmann KA, Sakaki S en Zimmermann V (1977) Cation activities in reversible ischemia of the cat brain. *Stroke* 8:77-81

- Inamura K, Smith ML, Olsson Y en Siesjö BK (1988) Pathogenesis of substantia nigra lesions following hyperglycemic ischemia: Changes in energy metabolites, cerebral blood flow, and morphology of pars reticulata in a rat model of ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:375-384
- Irina T, Watanabe M, Nishide M, Gotoh M en Tsuchiya T (1983) Angiographical analysis of acute cerebral infarction followed by "cascade"-like deterioration of minor neurological deficits. What is progressing stroke? *Stroke* 14:363-368
- Ito U, Go KG, Walker JT, Spatz M en Klatzo I (1976) Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils III. Behaviour of the Blood-Brain Barrier. *Acta Neuropath (Berl)* 34:1-6
- Januszewicz von Lubitz DKE, Dambrosia JM en Redmond DJ (1989) Protective effect of cyclohexyl adenosine in treatment of cerebral ischemia in gerbils. *Neuroscience* 30:451-462
- Johshita H, Asano T, Hanamura T en Takakura K (1989) Effect of indomethacin and a free radical scavenger on cerebral blood flow and edema after cerebral artery occlusion in cats. *Stroke* 20:788-794
- Jones EJ (1985a) Principles of thalamic organization. Pag. 86-149 uit: *The Thalamus*. Plenum Press, New York
- Jones EJ (1985b) The posterior complex of nuclei. Pag. 574-604 uit: *The Thalamus*. Plenum Press, New York
- Kalimo H, Rehncrona S, Söderfeldt B, Olsson Y en Siesjö BK (1981) Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:313-327
- Kanner BI en Sharon I (1978) Active transport of L-Glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* 17:3949-3953
- Kaplan TM, Lasner TM, Nadler JV en Crain BJ (1989) Lesions of the excitatory pathways reduce hippocampal cell death after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol* 78:283-290
- Kato H, Kogure K, Ohtomo H, Izumiyama M, Tobita M, Matsui S, Yamamoto E, Kohno H, Ikebe Y en Watanabe T (1986) Characterization of experimental ischemic brain edema utilizing proton magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:212-221
- Keykahl MM, Hägerdal M, Welsh FA, Barrer MA, Sisco F en Harp JR (1980) Effect of high vs. low arterial blood oxygen content on cerebral energy metabolite levels during hypoxia with normothermia and hypothermia in the rat. *Anesthesiology* 52:492-495
- Kirsch JR en D'Alecy LG (1984) Hypoxia induced preferential ketone utilization by rat brain slices. *Stroke* 15:319-323
- Klein HC, Postema F, Krop W en Korf J (1989) Striatal impedance to follow the release of amino acid neurotransmitters and lactate and to predict damage in a repetitive hypoxic ischemic model. Pag. 251-255 uit *Pharmacology of cerebral ischemia*. Redactie: Kriegelstein. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mBH, Stuttgart, Duitsland
- Klein HC, de Boer J, van der Kuil JHF, Postema F, Krop W, Go KG en Korf J (1990) Impedance reflecting irreversible outcome in single and repetitive hypoxic exposures: Correlative studies

- with brain monitoring of glucose and lactate. Pag. 33-37 uit: Pharmacology of Cerebral ischemia. Redactie: Krieglstein J en Oberpichler. Wissenschaftliche verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Duitsland
- Korf J en Postema F (1984) Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J Neurochem* 43:1052-1060
- Korf J, Klein HC, Venema K en Postema F (1988) Increases in striatal and hippocampal impedance and extracellular levels of amino acids by cardiac arrest in freely moving rats. *J Neurochem* 50:1087-1096
- Kraig RP, Ferreira-Filho CR en Nicholson C (1983) Alkaline and acid transients in cerebellar microenvironment. *J Neurophysiol* 49:831-850
- Kraig RP en Chesler M (1990) Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:104-114
- Kuhr WG, van den Berg CJ en Korf J (1988) In vivo identification and quantitative evaluation of carrier-mediated transport of lactate at the cellular level in the striatum of conscious, freely moving rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:848-856
- Kushner M, Nencini P, Reivich M, Rango M, Jamieson D, Fazekas F, Zimmermann R, Chawluk J, Alavi A en Alves W (1990) Relation of hyperglycemia early in ischemic brain infarction to cerebral anatomy, metabolism, and clinical outcome. *Ann Neurol* 28:129-135
- Lazarewicz JW, Pluta R, Salinska E en Puka M (1989) Beneficial effect of nimodipine on metabolic disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke* 20:70-77
- Lemay DR, Gehua L, Zelenock GB, D'Alecy LG (1988) Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats. *Stroke* 19:1411-1419
- Levine S (1960) Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36:1-17
- Levy DE (1988) How transient are transient ischemic attacks? *Neurology* 38:674-677
- Lin B, Globus MYT, Dietrich WDD, Busto R, Martinez E, Kraydieh S en Ginsberg MD (1991) Different morphological and neurochemical sequelae of global ischemia: Comparison of single- and multiple-insult paradigms. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S854
- Lin CS, Polsky K, Nadler JV en Crain BJ (1990) Selective neocortical and thalamic cell death in the gerbil after transient ischemia. *Neuroscience* 35:289-299
- Lipton P (1973) Effects of membrane depolarization on light scattering by cerebral cortical slices. *J Physiol* 231:365-383
- Ljunggren B, Norberg K en Siesjö BK (1974) Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia. *Brain Res* 77:173-186
- Lockshin RA en Zakeri ZF (1990) Programmed cell death: New thoughts and relevance to aging. *J Gerontol* 45:B135-B140
- Lougheed WM, Sweet WH, White JC en Brewster WR (1955) The use of hypothermia in surgical treatment of cerebral vascular lesions. A preliminary report. *J Neurosurg* 12:240-255
- Lundy EF, Kuhn JE, Kwon JM, Zelenock GB en D'Alecy LG (1987) Infusion of five percent dextrose increases mortality and morbidity following six minutes of cardiac arrest in resuscitated



dogs. *J Critical Care* 2:4-14

Lutz PL, McMahon P, Rosenthal M en Sick TJ (1984) Relationship between aerobic and anaerobic energy production in turtle brain in situ. *Am J Physiol* 247:R740-R744

MacMillan V (1982) Cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity during exposure to and recovery from acute ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2:457-465

Mans AM, Davis DW en Hawkins RA (1987) Regional brain glucose use in unstressed rats after two days of starvation. *Metab Brain Disease* 2:213-221

Marie C, Bralet AM, Gueldry S en Bralet J (1990) Fasting prior to transient cerebral ischemia reduces delayed neuronal necrosis. *Metab Brain Disease* 5:65-75

Matsumoto M, Kitagawa K, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Handa N, Kimura K en Kamada T (1991) Induction of tolerance to ischemic neuronal damage may be related to the production of heat shock protein. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S344

Matsuoka Y en Hossmann KA (1982) Cortical impedance and extracellular volume changes following middle cerebral artery occlusion in cats. *Stroke* 2:466-474

McGeorge AJ en Faull RLM (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-537

McLennan (1976) The autoradiographic localization of L-[<sup>3</sup>H] glutamate in rat brain tissue. *Brain Res* 115:139-144

Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A en Fronza G (1989) Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol* 90:29-32

Meyer FB, Sundt TM, Yanagihara T en Anderson RE (1987) Focal cerebral ischemia: Pathophysiological mechanisms and rationale for future avenues of treatment. *Mayo Clin Proc* 62:35-55

Michenfelder JD en Milde JH (1977) Failure of prolonged hypocapnia, hypothermia, or hypertension to favorably alter acute stroke in primates. *Stroke* 8:87-91

Minamisawa H, Smith ML en Siesjö BK (1990) The effect of mild hyperthermia and hypothermia on brain damage following 5, 10, and 15 minutes of forebrain ischemia. *Ann Neurol* 28:26-33

Mohamed AA, McCulloch J, Mendelow AD, Teasdale GM en Harper AM (1984) Effect of the calcium antagonist Nimodipine on local cerebral blood flow: Relationship to arterial blood pressure. *J Cereb Blood Flow Metab* 4:206-211

Mohr JP, Gautier JC, Hier DB en Stein RW (1986) Middle cerebral artery. Pag. 377-450 uit: *Stroke; Pathophysiology, diagnosis, and management*. Redactie: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM en Yatsu FM. Churchill Livingstone, New York

Morris ME, Leblond J, Agopyan N en Krnjević K (1991) Temperature dependence of extracellular ionic changes evoked by anoxia in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 65:157-167

Mudd LM, Werner H, Shen-Orr Z, Roberts CT, LeRoith D, Haspel HC en Raizada MK (1990) Regulation of rat brain/HepG2 glucose transporter gene expression by phorbol esters in primary cultures of neuronal and astrocytic glial cells. *Endocrinology* 126:545-549

- Nadler J en Evenson DA (1983) Use of excitatory amino acids to make axon-sparing lesions of hypothalamus. *Meth Enzymol* 103:393-400
- Namba H, Lucignani G, Nehlig A, Patlak C, Pettigrew K, Kennedy C en Sokoloff L (1987) Effects of insulin on hexose transport across blood-brain barrier in normoglycemia. *Am J Physiol* 252:E299-E303
- Naritomi H, Sasaki M, Kanashiro M, Kitani M en Sawada T (1988) Flow thresholds for cerebral energy disturbance and Na<sup>+</sup> pump failure as studied by in vivo <sup>31</sup>P and <sup>23</sup>Na Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:16-23
- Natale JE en D'Alecy LG (1989) Protection from cerebral ischemia by brain cooling without reduced lactate accumulation in dogs. *Stroke* 20:770-777
- Nedergaard M en Diemer NH (1987) Focal ischemia of the rat brain, with special reference to the influence of plasma glucose concentration. *Acta Neuropathol* 73:131-137
- Nedergaard M, Kraig RP, Tanabe J en Pulsinelli WA (1990) Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am J Physiol* 260:R581-588
- Olney JW, Ikonomidou C, Mosinger JL en Friedrich G (1989) MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain. *J Neurosci* 9:1701-1704
- Olsen TS, Larsen B, Herning M, Skriver EB, Lassen NA (1983) Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue. Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke. *Stroke* 14:332-341
- Olsson T, Åström, Eriksson S en Forsell Å (1989) Hypercortisolism revealed by the dexamethasone suppression test with acute ischemic stroke. *Stroke* 20:1685-1690
- Oyzurt E, Graham DI, Woodruff GN en McCulloch J (1988) Protective effect of the glutamate antagonist, MK-801 in focal cerebral ischemia in the cat. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:138-143
- Palmer GC, Palmer SJ, Christie-Pope BC, Callahan AS, Taylor MD en Eddy LJ (1985) Classification of ischemic-induced damage to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in gerbil forebrain. Modification by therapeutic agents. *Neuropharmacology* 24:509-516
- Pardridge WM (1983) Brain metabolism: A perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev* 63:1481-1535
- Pardridge WM en Oldendorf WH (1975) Kinetics of blood-brain barrier transport of hexoses. *Biochim Biophys Acta* 382:377-392
- Park CK, Nehls DG, Graham DI, Teasdale GM en McCulloch J (1988) The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 24:543-551
- Paxinos G en Watson C (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney
- Pekar J, Lyon R, Ligeti L, Sinnwell T, Mayevski A en McLaughlin A (1991) Monitoring cerebral sodium levels with multiple quantum filtered <sup>23</sup>Na NMR. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S784
- Pelligrino D, Almquist LO en Siesjö BK (1981) Effects of insulin-induced hypoglycemia on intracellular pH and impedance in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res* 221:129-147
- Picozzi P, Todd V en Crockard A (1985) Regional Blood-Brain barrier permeability changes after

restoration of blood flow in postischemic gerbil brains: A quantitative study. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:10-16

Prado R, Ginsberg MD, Dietrich WD, Watson BD en Busto R (1988) Hyperglycemia increases infarct size in collaterally perfused but not end-arterial territories. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:186-192

Prenen GHM, Go KG, Postema F, Zuiderveen F en Korf J (1988) Cerebral cation shifts in hypoxic-ischemic brain damage are prevented by the sodium channel blocker tetrodotoxin. *Exp Neurol* 99:118-132

Price TR (1986) Progressing ischemic stroke. Pag. 1059-1068 uit: *Stroke; Pathophysiology, diagnosis, and management*. Redactie: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM en Yatsu FM. Churchill Livingstone, New York

Pulsinelli WA, Brierly JB en Plum F (1982a) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11:491-498

Pulsinelli WA, Levy DE en Duffy TE (1982b) Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11:499-509

Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D en Plum F (1982c) Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: A neuropathologic study in the rat. *Neurology* 32:1239-1246

Pulsinelli WA, Levy DE, Sigsbee B, Scherer P en Plum F (1983) Increased damage after ischemic stroke in patients with hyperglycemia with or without established diabetes mellitus. *Am J Med* 74:540-544

Ramakrishna Kurup CK, Kumaroo KK en Dutka AJ (1990) Influence of cerebral ischemia and post-ischemic reperfusion on mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Bioenergetics and Biomembranes* 22:61-80

Rehncrona S, Rosén I en Siesjö BK (1981) Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: Biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:297-311

Robertson CS en Grossmann RG (1987) Protection against spinal cord ischemia with insulin-induced hypoglycemia. *J neurosurg* 67:739-744

Ross DT en Ebner FF (1990) Thalamic retrograde degeneration following cortical injury: An excitotoxic process? *Neuroscience* 35:525-550

Ruderman NB, Ross PS, Berger M en Goodman MN (1974) Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats. *Biochem J* 138:1-10

Salford LG, Plum F en Brierley JB (1973) Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol* 29:234-238

Salford LG en Siesjö BK (1974) The influence of arterial hypoxia and unilateral carotid artery occlusion upon regional blood flow and metabolism in the rat brain. *Acta Physiol Scand* 92:130-141

Schuer FJ en Hossmann KA (1980) Experimental brain infarcts in cats. II. Ischemic brain edema. *Stroke* 11:593-601

- Scremin OU en Jenden DJ (1989a) Focal ischemia enhances choline output and decreases acetylcholine output from rat cerebral cortex. *Stroke* 20:92-95
- Scremin OU en Jenden DJ (1989b) Effects of middle cerebral artery occlusion on cerebral cortex choline and acetylcholine in rats. *Stroke* 20:1524-1530
- Selman WR, Crumrine RC, Ricci AJ, en LaManna JC, Ratcheson RA en Lust WD (1990) Impairment of metabolic recovery with increasing periods of middle cerebral occlusion in rats. *Stroke* 21:467-471
- Siemkowicz E (1985) The effect of glucose upon restitution after transient cerebral ischemia: A summary. *Acta Neurol Scand* 71:417-427
- Siemkowicz E en Hansen AJ (1978) Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats. *Acta Neurol Scand* 58:1-8
- Siesjö BK (1978) *Brain Energy Metabolism*. Uitgever Wiley and sons, Chichester
- Siesjö BK en Bengtsson (1990) Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: A unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:127-140
- Silver IA en Erecińska M (1990) Intracellular and extracellular changes of  $[Ca^{2+}]$  in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol* 95:837-866
- Steen PA, Soule EH en Michenfelder JD (1979) Detrimental effect of prolonged hypothermia in cats and monkeys with and without regional cerebral ischemia. *Stroke* 10:522-529
- Storey KB (1987) Suspended animation: The molecular basis of metabolic depression. *Can J Zool* 66:124-132
- Strong AJ, Miller SA en West IC (1985) Protection of respiration of crude mitochondrial preparation in cerebral ischaemia by control of blood glucose. *J Neurol Neurosurg and Psychiatry* 48:450-454
- Strong AJ, Venables GS en Gibson G (1983a) The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 1. Topography of changes in blood flow, potassium ion activity, and EEG. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:86-96
- Strong AJ, Tomlinson BE, Venables GS, Gibson G en Hardy JA (1983b) The cortical ischemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 2. Studies of histopathology, water content, and in vitro neurotransmitter uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:97-108
- Strong AJ, Fairfield JE, Monteiro E, Kirby M, Hogg AR, Snape M en Ross-Field L (1990) Insulin protects cognitive function in experimental stroke. *J Neurol neurosurg and psychiatry* 53:847-853
- Strubbe JH en Alingh Prins AJ (1986) Reduced insulin secretion after short term food deprivation in rats play a key role in the adaptive interaction of glucose and free fatty acid utilization. *Physiol Behav* 37:441-445
- Swan JH, Evans MC en Meldrum BS (1988) Long term development of selective neuronal loss and the mechanism of protection by 2-amino-7-phosphonoheptanoate in a rat model of incomplete forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:64-78

- Takanashi Y, Chopp M, Levine SR, Moran J, Tepley N en Barkley GL (1991) Hypoxic depolarization in anesthetized rats characterized by DC magnetencephalography. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:S419
- Tanimoto M en Okada Y (1987) The protective effect of hypothermia on hippocampal slices from guinea pig during deprivation of oxygen and glucose. *Brain Res* 417:239-246
- Tombough GC en Sapolsky RM (1990) Mild acidosis protects hippocampal neurons from injury induced by oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 506:343-345
- Tomida S, Nowak TS, Vass K, Lohr JM en Klatzo I (1987) Experimental model for repetitive ischemic attacks in the gerbil: The cumulative effect of repeated ischemic insults. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:773-782
- Towart R en Kazda S (1982) Preferential vasodilator actions of the calcium antagonists nimodipine (Bay e 9736), nifedipine and verapamil on contraction of cerebral vascular smooth muscles induced by neurotransmitter and vasoconstrictor substances. Pag 29-38 uit: *Cerebral Blood Flow: Effect of nerves and neurotransmitters*. Redactie: Heistad DD en Marcus ML. Elsevier, Nederland.
- Uematsu D, Greenberg JL, Hickey WF en Reivich M (1989) Nimodipine attenuates both increase in cytosolic free calcium and histologic damage following focal cerebral ischemia and reperfusion in cats. *Stroke* 20:1531-1537
- Uematsu D, Greenberg JL, Reivich M en Karp A (1988) In vivo measurement of cytosolic free calcium during cerebral ischemia and reperfusion. *Ann Neurol* 24:420-428
- Van Harreveld A (1972) The extracellular space in the vertebrate central nervous system. Uit: *The structure and function of nervous tissue volume IV*. Redactie: GH Bourne. Academic press, New York
- Van Harreveld A en Ochs S (1956) Cerebral impedance changes after circulatory arrest. *Am J Physiol* 187:180-192
- Van der Kuil JHF en Korf J (1991) On-line monitoring of extracellular brain glucose using microdialysis and a NADPH-linked enzymatic assay. *J Neurochem* 57:648-654
- Vass K, Hossmann KA, Nowak TS en Klatzo I (1988) Microvascular disturbances and edema formation after repetitive ischemia of gerbil brain. *Acta Neuropathol* 75:288-294
- Vázquez-Cruz J, Martí-Vilalta JL, Ferrer I, Pérez-Gallofré A en Folch J (1990) Progressing cerebral infarction in relation to plasma glucose in gerbils. *Stroke* 21:1621-1624
- Vibulsrath S, Dietrich WD, Busto R en Ginsberg MD (1987) Failure of Nimodipine to prevent ischemic neuronal damage in rats. *Stroke* 18:210-216
- Vos J (1990) 3: Informatie over de verleende medische zorg bij cerebrovasculaire accidenten (CVA's) en herseninfarcten. Uit: *ziekten in beeld*. Van: Sig, informatiecentrum voor de gezondheidszorg, Utrecht

- Walker PS, Donovan JA, VanNess BG, Fellows RE en Pessin JE (1988) Glucose dependent regulation of glucose transport activity protein and mRNA in primary cultures of rat brain glial cells. *J Biol Chem* 263:15594-
- Walz W en Harold DE (1990) Brain lactic acidosis and synaptic function. *Can J Physiol Pharmacol* 68:164-169
- Walz W en Mukerji S (1988) Lactate release from cultured astrocytes and neurons: A Comparison. *Glia* 1:366-370
- Warner DS, Smith ML en Siesjö BK (1987) Ischemia in normo- and hyperglycemic rats: Effects on brain water and electrolytes. *Stroke* 18:464-471
- Warner MA, Neill KH, Nadler V en Crain BJ (1991) Regionally selective effects of NMDA receptor antagonists against ischemic brain damage in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:600-610
- Waxman SG en Toole JF (1983) Temporal profile resembling TIA in the setting of cerebral infarction. *Stroke* 14:433-437
- Weissman C (1990) The metabolic response to stress: An overview and update. *Anesthesiology* 73:308-327
- Welsh FA, Sims RE en McKee AE (1983) Effect of glucose on recovery of energy metabolism following hypoxia-oligemia in mouse brain: Dose dependence and carbohydrate specificity. *J Cereb Blood Flow Metab* 3:486-492
- Welsh FA, Ginsberg MD, Rieder W en Budd WW (1980) Deleterious effect of glucose pretreatment on recovery from diffuse cerebral ischemia in the cat. II. Regional metabolite levels. *Stroke* 11:355-363
- Widnell CC, Baldwin SA, Davies A, Martin S en Pasternak CA (1990) Cellular stress induces a redistribution of the glucose transporter. *FASEB J* 4:1634-1637
- Williamson DH en Mellanby J (1970) D- $\beta$ -hydroxybutyrate. Pag. 1772-1773 uit: *Methoden der enzymatischen Analysen*. Redactie: Bergmeyer HV. Verlag Chemie, Weinheim, Duitsland
- Woo E, Chan YW, Yu YL en Huang CY (1988) Admission glucose level in relation to mortality and morbidity outcome in 252 stroke patients. *Stroke* 19:185-191
- Yamaguchi T (1986) Cerebral extracellular potassium concentration change and cerebral impedance change in short-term ischemia in gerbil. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 33:1-8
- Yang XC en Sachs F (1989) Block of stretch-activated ion channels in xenopus oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 243:1068-1071
- Young RSK, Oleginski TP, Yagel SK en Towfigi J (1983) The effect of graded hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage: A neuropathologic study in the neonatal rat. *Stroke* 14:929-934
- Zilles K (1985) The cortex of the rat. A stereotaxic atlas. Springer verlag, Berlijn.



## 12. Samenvatting

Ischemie -een onderbreking van de bloedtoevoer- veroorzaakt acute uitvalsverschijnselen. Dit betreft vaak de spraak (afasie) en motoriek (parese, paralyse) van aangezicht en ledematen. Naast deze neurologische verschijnselen geeft ischemie acute veranderingen van cerebrale activiteit (EEG), iongradiënten van  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  en  $\text{Ca}^{2+}$  over de celmembranen, extracellulaire neurotransmitters (o.a. glutamaat, aspartaat, gamma-aminoboterzuur, GABA, taurine, dopamine, adenosine), intracellulaire second messengers ( $\text{Ca}^{2+}$ , PKC- systeem) en cellulair metabolisme (zuurstof- en glucose-consumptie, ATP- en melkzuur-productie).

Door recirculatie -herstel van de bloedtoevoer- na een korte ischemieperiode van 2-10 min zijn deze veranderingen omkeerbaar. Toch komt geringe neurologische uitval dan vaak voor. Dit is te wijten aan selectieve beschadiging van neuronen, en wel in bepaalde zeer gevoelige gebieden als de hippocampus. De op dit moment heersende hypothese is, dat selectieve schade wordt veroorzaakt door overgevoeligheid voor glutamaat en als gevolg daarvan toegenomen ion-stromen van met name  $\text{Ca}^{2+}$  in de periode van recirculatie.

Na een lange ischemieperiode ( $> 20$  min) is er vaak geen herstel van de genoemde cerebrale veranderingen en zijn er als regel globale uitvalsverschijnselen (afasie, paralyse). De schade is niet meer selectief neuronaal, maar uitgebreid tot gliacellen (infarct). Omdat hyperglycemie deze vorm van schade vergroot, wordt aangenomen dat het glucose-metabolisme en de daarmee gepaard gaande melkzuurvorming een rol speelt bij het ontstaan van het infarct. Deze oorzaak van schade is van universeel belang, omdat het elk gebied dat eraan wordt blootgesteld treft.

In de huidige studie is onderzoek gedaan naar de effecten van repetitieve, korte ischemische periodes op het ontstaan van hersenschade. Daartoe werd het model van Levine in de rat gemodificeerd tot een repetitief model. De episode wordt geïnduceerd door eenzijdige occlusie van de carotis arterie te combineren met beademing met een zuurstof arm (10 %) gasmengsel, waardoor de arteriële zuurstofspanning daalt van  $21,36 \pm 1,00$  naar  $4,56 \pm 0,17$  kPa (gemiddelde  $\pm$  standaard afwijking van gemiddelde), de arteriële bloeddruk (ABD) daalt van  $128,0 \pm 2,3$  naar  $50,9 \pm 2,8$  mmHg en de cerebrale bloeddoorstroming (CBF) eenzijdig relatief daalt.

Dit model heeft een aantal voordelen boven andere gebruikelijke modellen. Het is eenvoudig ischemie en recirculatie op te wekken door het veranderen van de beademing. Daarnaast is de ischemie onvolledig, hetgeen lijkt op de verandering in de periferie van



een permanent ischemisch gebied. Het onderzoek kan geschieden in de rat, een dier dat net groot genoeg is om voldoende bloed af te nemen voor de bepaling van bloedgasen als  $O_2$  en  $CO_2$  en de pH en concentratie van glucose. Als laatste, hersenschade ontstaat in één hersenhelft en dit vergroot het overlevingspercentage vergeleken met tweezijdige schade. Daarom is de geschiktheid voor overlevingsstudies groter.

Doordat tijdens ischemie netto meer ionen van extra- naar intra-cellulair gaan dan omgekeerd, treedt er osmotisch transport van water op met als gevolg celzwellen. De geleiding van weefsel voor wisselstroom geschiedt via de extracellulaire ruimte. Aan gezien deze tijdens ischemie krimpt ten koste van de intracellulaire ruimte, daalt de geleiding en dat wil zeggen, dat de weerstand cq. impedantie stijgt. De impedantie is een eenvoudige, continu registreerbare maat voor de netto ion-stromen in het weefselgebied tussen twee electrodes. In het Levine model ondergaat het striatum een goed reproduceerbare mate van ischemie.

De impedantiemeting werd gebruikt om in de fase van recirculatie te onderzoeken in hoeverre het falend herstel ervan het ontstaan van een infarct in het striatum voorspelt. Er werden afwisselend periodes van 10 min hypoxie-ischemie en 10 min normoxie-recirculatie gegeven, als regel totdat de impedantie zich niet herstelde.

In de eerste serie experimenten werd maximaal 5 keer hypoxie-ischemie gegeven ( $n=25$ ). Hiervan herstelde in 76 % van de gevallen de impedantie niet en dit was duidelijk binnen 20 min recirculatieuur. Uit de impedantie werden de omgekeerd evenredige veranderingen van het extracellulaire volume berekend (ECV). Het bleek, dat na 3 uur recirculatie het ECV nog steeds lager was dan het beginniveau ( $p < 0,0001$ , gepaarde Wilcoxon-test), en dat de daling maximaal was, omdat het ECV niet verder daalde na inductie van volledige ischemie. Het niveau van het ECV was significant lager dan controles met reversibel verloop al vóór de laatste hypoxieperiode en vanaf 20 minuten tot minstens 3 uur recirculatieuur. Er kon dus binnen 20 minuten recirculatieuur al gesproken worden van irreversibele impedantieverandering (IV) oftewel daling van het ECV.

Na 3 uur overleving werd hersenweefsel uitgenomen voor vlamfotometrische bepaling van Natrium en Kalium. Na irreversibele IV was de verhouding van Na over K significant verhoogd t.o.v. reversibele controles in het striatum ( $1,14 \pm 0,18$  versus  $0,43 \pm 0,03$ ;  $p < 0,02$ , deze en verder alle toetsen: Mann-Whitney U) en de frontale cortex ( $0,99 \pm 0,16$  versus  $0,47 \pm 0,02$ ;  $p < 0,02$ ). Er werd bij beide groepen geen verhoogde opname van geïnjecteerd Evans blauw door de bloed-hersen-barière (BHB) geconstateerd. Verandering van ionen in weefsel kunnen alleen geschieden door uitwisseling met het bloed. Dit gebeurde in het beschreven model blijkbaar bij een intacte BHB.

Na 4 uur recirculatie werd hersenweefsel geprepareerd voor onderzoek naar de opname

van zilver door beschadigde neuronen. De zilveropname was significant hoger bij irreversibele IV versus reversibele IV in doorgemeten gebieden in het striatum ( $2,12 \pm 0,07$  versus  $1,51 \pm 0,07$ ;  $p < 0,02$ ), in de frontale cortex ( $1,73 \pm 0,17$  versus  $1,16 \pm 0,18$ ;  $p < 0,02$ ) en in de thalamus ( $1,90 \pm 0,11$  versus  $1,34 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ). Na reversibele IV was de microscopische schade beperkt tot de gevoelige gebieden als caudolateraal striatum, cortex laag 3 en laterale thalamus en na irreversibel verloop waren deze structuren in hun totaliteit aangetast, was zilver verspreid tot buiten de celgrenzen en gliacel zwelling opgetreden, hetgeen verdergaande hersenschade inhoudt.

Na 24 uur was er geen overleving in de groep met irreversibele IV. Bij reversibele IV was er 44% mortaliteit en had de schade zich uitgebreid naar minder gevoelige gebieden. Het zilverneerslag bleef beperkt tot de neuron lichamen. De ernst van de hersenschade na irreversibel verloop wordt geïllustreerd door het acute en aselectieve optreden van neuronale schade en de hoge mortaliteit. Als hierbij de irreversibele en maximale (dus ook gliacel-) zwelling en de verhoging van weefsel (en dus ook gliacel) Na/K ratio betrokken wordt, maakt dit de aanname gerechtvaardigd, dat er sprake is van een infarct.

Er is onderzocht of irreversibele IV te voorkomen was door preventief ingrijpen met farmaca en door het metabolisme te veranderen. In de experimenten werd niet vaker dan 7 maal hypoxie toegediend. Er werd met permanente recirculatie begonnen op het moment dat er irreversibele IV optrad. Bij controles ( $n=10$ ) was er in 100 % van de gevallen irreversibele IV na 4 periodes (gemiddeld aantal reversibele periodes was  $2,80 \pm 0,13$ ). Het effect van behandeling werd onderzocht in groepen van telkens 4-6 experimenten.

Injectie van farmaca geschiedde 30 min voor het begin met hypoxie. Er werd 0,5 mg/kg nimodipine i.p. gegeven om de  $Ca^{2+}$  instroom via het L-type kanaal te blokkeren. MK-801 werd toegediend (10 mg/kg, i.v.) om het effect van glutamaat op de N-Methyl-D-Aspartaat receptor te blokkeren, ketanserine (2 mg/kg, i.p.) om hypoperfusie te voorkomen indomethacine (4 mg/kg i.v) plus allopurinol (7 mg/kg, i.v) om vrije radicaalvorming te remmen. Behalve nimodipine vertoonden deze farmaca geen effect op de bloeddruk en ECV en was er geen significante bescherming tegen irreversibele IV. Nimodipine veroorzaakte een verminderde daling van de bloeddruk tijdens hypoxie. Desondanks trad irreversibele IV iets eerder op ( $p < 0,05$ ).

Metabole veranderingen werden geïnduceerd door hersenkoeling gedurende repetitieve hypoxie, vasten gedurende 48 uur ervoor en 4 E/kg insuline injectie 30 min ervoor. Hersenkoeling tot  $32^{\circ}C$  beschermde niet ( $4,0 \pm 0,7$  reversibele periodes) en tot  $28^{\circ}C$  wel significant ( $6,4 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ) en dit ging gepaard met een significant hogere ECV aan het begin van de hypoxieperiode. Vasten voorkwam zeer significant irreversibiliteit ( $6,8 \pm 0,2$ ;  $p < 0,0002$ ) evenals insuline ( $6,5 \pm 0,2$ ;  $p < 0,002$ ). Na vasten was de

hersentemperatuur enigszins verlaagd (34-35 °C) vergeleken met controles (35-36 °C). De geringe daling kan de bescherming door vasten niet verklaren, omdat 32 °C geen beschermend effect had. Na vasten was de concentratie van glucose in het bloed verlaagd van  $5,10 \pm 0,33$  naar  $4,10 \pm 0,19$  mmol/l ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) en van  $\beta$ -hydroxy-boterzuur verhoogd van  $0,03 \pm 0,03$  naar  $0,97 \pm 0,15$  mmol/l ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ). Insuline injectie geeft een daling van glucose en  $\beta$ -hydroxy-boterzuur, dat te laag werd voor detectie.  $\beta$ -Hydroxy-boterzuur kan een fractie van het postischemisch metabolisme van glucose overnemen en mogelijk daardoor enige bescherming geven. Insuline heeft ook beschermende effecten onafhankelijk van bloedglucose.

De veranderingen van glucose in het bloed en van glucose in de extracellulaire ruimte werden gemeten bij controles, 24 uur gevasten en na insuline behandeling. Extracellulair glucose werd continu bepaald in de uitstromende vloeistof van een in het striatum geïmplanteerde dialyse cannule.

Tijdens hypoxie-ischemie nam de glucoseconcentratie in het bloed sterk toe bij controles (van  $5,3 \pm 0,2$  naar  $8,4 \pm 0,7$  mmol/l). Deze respons was praktisch afwezig na vasten (van  $4,3 \pm 0,1$  naar  $4,7 \pm 0,4$  mmol/l) en verminderd door insuline (van  $4,1 \pm 0,3$  naar  $5,9 \pm 0,5$  mmol/l).

De extracellulaire glucosespiegel nam af tijdens hypoxie-ischemie en nam toe tijdens normoxie-recirculatie. In de gevaste groep was de concentratie in extracellulair dialysaat significant lager dan bij controles vanaf de tweede hypoxie ( $p < 0,05$ ;  $n=5$  tegen  $n=5$ ). Bovendien herstelde extracellulair glucose zich over meerdere periodes genomen slechter bij gevasten (helling van  $-1,86 \pm 0,35$ ) dan bij controles (helling van  $-0,75 \pm 0,18$ , verschil  $p < 0,05$ ). De verhouding tussen de concentratie van glucose in het dialysaat en glucose in het bloed daalde na 3 periodes sterker bij gevasten ( $0,3 \pm 0,1$  %) dan bij controles ( $0,7 \pm 0,1$  %;  $p < 0,05$ ). Het progressief verlaagd extracellulair glucose kan enerzijds duiden op een verlaagde aanvoer van glucose vanuit het bloed en anderzijds op een verhoogde afvoer van glucose de cel in.

De effecten van 24 uur vasten op celschade, gedrag en sterfte zijn onderzocht in een overlevingsmodel. Het bleek, dat na 2 hypoxie periodes de cellulaire schade zich in het verloop van 24 uur maximaal ontwikkelde. De dieren leken ziek, omdat de haren overeind stonden, het gedrag geremd was, en niet werd gegeten of gedronken. Vaak liepen ze rondjes (7/9), en traden er epileptische insulten op (5/9). De sterfte was 44 %. Bij de gevaste dieren was er geen sterfte in de 24 uren periode (0/7). De dieren leken gezond, omdat ze direct na het bijkomen van de narcose actief waren, en wel aten en dronken. Soms liepen ze rondjes (3/7), en er werd geen epilepsie geobserveerd (0/7).

Hersencoupees werden zodanig geprepareerd, dat beschadigde neuronen zilver opnamen. Door vasten was de schade significant lager dan bij controles in gebieden in het striatum ( $1,42 \pm 0,11$  versus  $1,91 \pm 0,09$ ;  $p < 0,01$ ), in de cortex ( $0,96 \pm 0,06$  versus  $1,84 \pm 0,14$ ;  $p < 0,001$ ), in de thalamus ( $1,47 \pm 0,07$  versus  $2,13 \pm 0,17$ ;  $p < 0,005$ ), en de substantia nigra ( $1,14 \pm 0,12$  versus  $2,10 \pm 0,08$ ;  $p < 0,005$ ). In het striatum en de thalamus was de microscopische schade beperkt gebleven tot de gevoelige gedeelten (uiterste laterale gebied). Dit ging niet op voor de oppervlakkige laag van de cortex, die ondanks hoge gevoeligheid voor schade, bijna volledig beschermd werd. Mogelijk voorkomt de relatief hoge corticale consumptie van  $\beta$ -hydroxy-boterzuur ischemische schade aldaar.

In het repetitieve model kan onderscheid gemaakt worden tussen veranderingen tijdens hypoxie-ischemie en normoxie-recirculatie. Beschermende maatregelen kunnen invloed hebben op beide fasen. Hypothermie vertraagt bijvoorbeeld de uitstoot van glutamaat en de ophoping van Calcium tijdens ischemie, en versnelt het herstel van het glucoseverbruik tijdens recirculatie. Hypothermie werkt dus op verschillende processen in beide fasen. Vasten beperkt tijdens ischemie de omzetting van glucose tot melkzuur. Tijdens recirculatie is de cellulaire glucoseconsumptie waarschijnlijk verhoogd. Vasten heeft dus ook verschillende effecten in beide fasen.

De geobserveerde daling van de extracellulaire glucose geeft het netto effect weer van de opeenvolgende fasen, en wel een relatieve daling van glucose aanvoer over de BHB en een relatieve stijging van glucose afvoer naar de cellen. De verhoogde glucose opname wordt niet aangewend voor het herstel van het celvolume in opeenvolgende fasen, maar voorkomt wel irreversibiliteit. Mogelijk wordt glucose aangewend voor processen die de vitaliteit van de cel veilig stellen, zoals productie van bepaalde eiwitten.

Concluderend, repetitieve hypoxie-ischemie met irreversibele IV veroorzaakt zeer ernstige neuronale schade en waarschijnlijk infarcering van één hersenhelft. Hersenkoeling, vasten en insuline voorkomen de impedantieverandering en de eraan gerelateerde acute schade. Vasten voorkomt bovendien de neuronale schade, ziekte en sterfte, die binnen 24 uur recirculatie ontstaan. Vasten beschermt gevoelige (cortex) en relatief ongevoelige gebieden (mediale thalamus en mediale striatum). Een verlaagde extracellulaire glucosespiegel kan hierbij een belangrijke factor zijn.

Uit klinische studies is gebleken, dat de bloedspiegel van glucose bij binnenkomst in het ziekenhuis de uitkomst van een ischemische episode mede bepaalt. Bij een patiënt in de acute fase van hersenischemie moet hoog bloedglucose worden voorkomen. Er is additioneel onderzoek nodig om te bepalen of het verlagen van bloedglucose door bijvoor-

beeld maaglediging of injectie van insuline zin heeft, nadat de ischemische episode al heeft plaatsgevonden.

## 13. Summary

Ischemia -a reduction of cerebral blood flow- induces acute neurological deficit. Usually, an impairment of speech (aphasia) and movement (pareses, paralysis) of limbs and facial muscles occurs. Moreover, ischemia induces immediate reduction of EEG activity, movement of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  across the cellular membrane, elevation of the extracellular neurotransmitters glutamate, aspartate, gamma-amino butyrate, taurine, dopamine and adenosine in the extracellular space, activation of intracellular second messengers ( $\text{Ca}^{2+}$ , PKC system) and a derangement of cellular metabolism (oxygen- and glucose- consumption rate, ATP and lactic acid levels).

During recirculation after short lasting ischemia (2-10 min), these changes are reversible. Mild neurologic deficit is frequently observed, however. Selective neuronal damage in vulnerable areas such as the hippocampus occurs frequently. This is probably due to supersensitivity of hippocampal neurons to glutamate, and subsequent derangement of ionic gradients ( $\text{Ca}^{2+}$ ) during recirculation.

After long lasting ischemia ( $> 20$  min) no global recovery from those derangements occurs and generally severe neurological deficit is inflicted. Cerebral damage extends to neuronal and glial elements (infarction). Hyperglycemia increases the formation of lactic acid during ischemia and aggravates cerebral damage. Thus, overall glucose metabolism, and specifically, conversion of glucose into lactic acid may play a predominant role in the induction of infarction. Infarction is an important form of cerebral damage, as it can occur in any cerebral area.

In the present study, the effect of repetitive hypoxia-ischemia upon cerebral damage was investigated. For this purpose, a modified Levine model in the rat was used. A carotid artery was occluded, and thereafter, animals were made hypoxic by respiration with 10% oxygen, which induced a decrease of blood  $\text{pO}_2$  from  $21,36 \pm 1,00$  to  $4,56 \pm 0,17$  kPa (mean  $\pm$  standard error of the mean), a decrease of bloodpressure from  $128,0 \pm 2,3$  to  $50,9 \pm 2,8$  mmHg, and relative ischemia in a hemisphere.

The modified Levine model was used, because repetitive insults can be administered easily by changing artificial respiration. Moreover, incomplete ischemia is induced, which produces damage in large cerebral areas after a vascular occlusion. The rat is of a size to allow repeated extraction of blood for the measurement of the blood gases  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$ , pH and glucose. Finally, in the present model cerebral damage occurs in a single hemisphere, which improves long term survival after ischemia in comparison to bilateral ischemia. Thus, the model is also appropriate for the study of cerebral damage after long

term survival.

During ischemia a net flux of ions and water occurs from the extracellular- into the intracellular- compartment, causing a simultaneous reduction of extracellular volume (ECV) and cellular swelling. The conductance of electrical current in brain tissue occurs through the extracellular compartment. Therefore, ischemia induces a decrease of tissue conductance i.e. an increase of tissue impedance, reflecting cellular swelling. In the Levine model, the striatum is subjected to ischemia of reproducible severity, which is similar to other structures in the forebrain. It was investigated, whether irreversible incline of the impedance in the striatum predicts the occurrence of severe damage in the recirculation phase. In all experiments periods of 10 min hypoxia-ischemia and 10 min normoxia-recirculation were induced repetitively, usually until irreversible change of the impedance (CI) occurred.

In the first series of experiments ultimately 5 times of hypoxia-ischemia were induced ( $n=25$ ). Of these cases, 76 % showed irreversible CI of the ipsilateral striatum within 20 min of the final normoxia-recirculation period. The ECV showed a significant decline from initial value until at least 3 hours recirculation ( $p < 0,0001$ , paired Wilcoxon test), and no further decline was observed after induction of complete ischemia. The ECV of the group with irreversible CI differed significantly from the control group with reversible CI, during the forelast recirculation period, and from 10 minutes until at least 3 hours of final recirculation. Thus, within 20 min of recirculation the distinction between irreversible and reversible outcome becomes evident.

After 3 hours of recirculation the tissue content of Na and K was measured by flame photometry. The Na/K ratios were significantly elevated after irreversible CI as compared to reversible CI in the striatum ( $1,14 \pm 0,18$  versus  $0,43 \pm 0,03$ ;  $p < 0,02$ , Mann-Whitney U test) and frontal cortex ( $0,99 \pm 0,16$  versus  $0,47 \pm 0,02$ ;  $p < 0,02$ ). In both groups, no extravasation of Evans Blue through the blood-brain barrier (BBB) was observed. Apparently, the observed change of tissue cations took place by transport across the intact BBB.

After 4 h of recirculation brain tissue was prepared for the study of silver impregnation by damaged neurons. A significantly higher silver uptake was observed after irreversible CI in comparison to reversible CI in the striatum ( $2,12 \pm 0,07$  versus  $1,51 \pm 0,07$ ;  $p < 0,02$ ), frontal cortex ( $1,73 \pm 0,17$  versus  $1,16 \pm 0,18$ ;  $p < 0,02$ ), and thalamus ( $1,90 \pm 0,11$  versus  $1,34 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ). After reversible CI, only the relatively sensitive caudolateral striatum, lateral thalamus and superficial cortical layers showed distinct neuronal damage, in contrast to global neuronal damage, loss of neuronal structure and glial swelling after irreversible outcome.

After 24 h all rats in the irreversible group had died versus 44% in controls. In reversible controls, neuronal structure was still intact, but damage had spread to less sensitive areas. It may be concluded, that irreversible CI caused acute and global cerebral damage, maximal cellular swelling and elevation of Na/K ratio in neurons and glial cells and thus probably induces infarction.

The prevention of irreversible CI by treatment with drugs and the manipulation of metabolism were investigated. Ultimately 7 periods of hypoxia-ischemia were administered. After irreversible CI permanent recirculation was induced. This occurred in all controls ( $n=10$ ) within 4 hypoxic-ischemic periods ( $2,80 \pm 0,13$  reversible periods). After protective treatment, however, this could be delayed until 7 or more episodes. The effect of each treatment was investigated in 4 to 6 experiments.

Drugs were injected 30 min before hypoxia-ischemia (for each treatment  $n=4-5$ ). Nimodipine was administered ( $0,5$  mg/kg, i.p.) to block voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx, MK-801 was injected ( $10$  mg/kg, i.v.) to block the effect of glutamate on the N-Methyl-D-Aspartate receptor, ketanserin ( $2$  mg/kg, i.p.) to prevent cerebral hypoperfusion, and indomethacin ( $4$  mg/kg, i.v.) plus allopurinol ( $7$  mg/kg, i.v.) to inhibit oxygen free radical generation. Except nimodipine, no substance showed an effect on ECV and blood pressure, nor prevented irreversible CI. Due to nimodipine the hypoxic decline of the blood pressure attenuated, but irreversible CI occurred earlier ( $p < 0,05$ ).

Metabolic change was induced during repetitive insults by brain cooling, and before the insults by 48 hour fasting and intravenous injection of  $4$  U/kg insulin. Cooling the brain to  $32^\circ\text{C}$  did not postpone irreversibility ( $4,0 \pm 0,7$  reversible periods), whereas  $28^\circ\text{C}$  did protect ( $6,4 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ). Moreover, the decline of the ECV during hypoxia was attenuated. Significant protection was offered by fasting ( $6,8 \pm 0,2$ ;  $p < 0,0002$ ), and insulin ( $6,5 \pm 0,2$ ;  $p < 0,002$ ). Due to fasting the brain temperature declined about a centigrade as compared to controls (from  $35-36$  to  $34-35^\circ\text{C}$ ). Protection cannot be explained by hypothermia alone, because more severe hypothermia ( $32^\circ\text{C}$ ) did not provide protection. Due to fasting the blood glucose content decreased from  $5,10 \pm 0,33$  to  $4,10 \pm 0,19$  mmol/l ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ) and  $\beta$ -OH-butyrate increased from  $0,03 \pm 0,03$  to  $0,97 \pm 0,15$  mmol/l ( $p < 0,05$ ;  $n=5$ ). A reduction of  $\beta$ -OH-butyrate was expected after insulin administration, and thus its concentration fell below detection limit. The elevated  $\beta$ -OH-butyrate due to fasting may have had some protective effect by improving post-ischemic metabolism. In addition, insulin may also have a distinct protective effect unrelated to blood glucose.

The blood content of glucose and extracellular glucose was measured in fasted,  $4$  U/kg



insulin treated, and control rats. Changes of extracellular glucose were monitored by the continuous detection of the fluid released into a striatal dialysis cannula.

During hypoxia-ischemia blood glucose increased from  $5,3 \pm 0,2$  to  $8,4 \pm 0,7$  mmol/l. The increment was virtually absent after fasting (from  $4,3 \pm 0,1$  to  $4,7 \pm 0,4$  mmol/l) and was attenuated by insulin (from  $4,1 \pm 0,3$  to  $5,9 \pm 0,5$  mmol/l).

Extracellular glucose decreased during each hypoxic-ischemic phase and increased during each normoxia-recirculation phase. Glucose in dialysate was significantly lower after fasting as compared to controls from the second hypoxic period onwards ( $p < 0,05$ ; both groups  $n=5$ ). In addition, the recovery of glucose during several hypoxic-ischemic periods was more progressively impaired in fasted (slope =  $-1,86 \pm 0,35$ ) as compared to controls (slope =  $-0,75 \pm 0,18$ ;  $p < 0,05$ ). Moreover, the extracellular glucose over blood glucose ratio decreased more severely after fasting ( $0,3 \pm 0,1$  %) as compared to controls ( $0,7 \pm 0,1$  %;  $p < 0,05$ ). The changes of extracellular glucose in the extracellular space due to fasting indicate, that either the inflow of glucose from the blood is decreased, or the outflow of glucose into the cells increased.

The effect of fasting on behaviour, mortality, and cellular damage was investigated during long term survival. Two hypoxic periods appeared to inflict the most severe damage during a 24 hour recirculation period in controls. During these 24 hours the rats appeared ill, were sluggish, did not eat or drink, usually walked in circles (7/9), and sometimes showed convulsions (5/9). Mortality reached 44 %. Fasted rats appeared healthy, were active immediately after recovery from anaesthesia, ate and drank, sometimes walked in circles (3/7), and showed no seizures.

After 24 hours brain tissue was perfusion fixed and later slices were cut and impregnated with silver to stain damaged neurons. After fasting, the silver content was reduced as compared to controls in the striatum ( $1,42 \pm 0,11$  versus  $1,91 \pm 0,09$ ;  $p < 0,01$ ), in cortex ( $0,96 \pm 0,06$  versus  $1,84 \pm 0,14$ ;  $p < 0,001$ ), in thalamus ( $1,47 \pm 0,07$  versus  $2,13 \pm 0,17$ ;  $p < 0,005$ ), and substantia nigra ( $1,14 \pm 0,12$  versus  $2,10 \pm 0,08$ ;  $p < 0,005$ ). Still, neuronal damage occurred in the sensitive areas of the striatum (caudo-lateral) and thalamus (lateral complex). In the cortex however, the sensitive superficial layers were markedly protected. Possibly, the relatively high cortical consumption of  $\beta$ -OH-butyrate explains the more than average improvement of cortical viability.

In the repetitive model, the phase of hypoxia-ischemia and of normoxia-recirculation can be distinguished. Both phases are influenced by protective measures. Hypothermia for instance, attenuates the release of glutamate and  $\text{Ca}^{2+}$  during ischemia, whereas glucose oxidation is increased during recirculation. Thus, hypothermia exerts a different effect in

either phase. Due to fasting, the glucose utilization becomes increased during recirculation. In contrast, glucose utilization is increased during recirculation. Fasting also exerts different effects during hypoxia-ischemie and normoxia recirculation.

In the present study, a progressive reduction of extracellular glucose is observed. It indicates, that glucose transport from the blood is progressively reduced, or glucose uptake into cells progressively increased. The rate of cell volume normalization was not influenced, but irreversible cellular swelling and severe damage were prevented. Probably glucose is used preferentially to safeguard cell viability e.g. by the production of protective proteins.

In conclusion, repetitive hypoxia-ischemia resulting in irreversible change of the impedance causes severe cerebral damage, probably infarction. Brain cooling, fasting, and insulin prevented acute damage. Additionally, fasting prevented morbidity, mortality, and neuronal death developing during long term recovery. It prevents damage in sensitive areas (superficial layers of the cortex), and in relatively insensitive areas (medial thalamus and medial striatum). Probably, the reduced extracellular glucose concentration plays an important protective role.

It appeared in clinical studies, that high blood glucose levels at admission contribute to severe neurological deficit. It remains unclear if insulin or gastric lavage are protective after an ischemic insult has taken place. Our results justify the investigation of the protective effect of minor hypoglycemia in the clinical setting.

## Woorden van dank

Al tijdens de studie geneeskunde kwam ik in contact met de afdeling Biologische Psychiatrie tijdens het volgen van een keuzeproject en vervolgens door 3 maanden onderzoek te doen onder begeleiding van Jaap Korf. De experimenten voor dit proefschrift zijn gedaan op deze afdeling dankzij een subsidie van de Nederlandse Hartstichting. Dankzij de welwillende hulp van de vakgroepen Neurologie, Ontwikkelingsneurologie (K. Bosma, B. de Roos en Dr. Ir. J.E. Vos), Kindergeneeskunde (Dr. R. Berger en R. Bloem), Experimentele Neurochirurgie (F. Zuiderveen), Medische Genetica (Dr. Ir. G.J. te Meerman), Dierfysiologie (Dr. P.G.M. Luiten) en de Centrale Fotodienst (W. Haaima) was het mogelijk alle benodigde bepalingen te doen en de gegevens te verwerken.

Mijn beide promotoren Jaap Korf en Gwan Go wil ik allereerst danken voor hun grote bereikbaarheid. Jullie stonden altijd open voor overleg. Jaap, je hebt me gestimuleerd om de literatuur goed te volgen en daaruit relevante vragen te formuleren. Zonder jouw onbevooroordeelde kijk op wetenschappelijke gegevens en je nadruk op uitvoerbaarheid van experimenten was dit proefschrift er niet geweest. Gwan, ik heb groot respect voor je kennis van de theorie en praktijk van het hersenmetabolisme. Je hebt me erg geholpen onze resultaten in een breed perspectief te zien.

Dank je Willy, voor je geweldige inzet en betrokkenheid. De moeilijkste experimenten kon jij laten slagen. Door jouw opmerkzaamheid zijn we het effect van vasten gaan onderzoeken. Ook het organiseren van ludieke acties was bij jou in goede handen. Beste Jaep de Boer en Dick Jaarsma. Het was erg nuttig om met jullie hardop na te denken over allerlei praktische en onpraktische problemen. Jaep, bedankt voor het meedenken over het model en de microdialyse-techniek. Dank je Dick, voor de hulp bij het opzetten van de zilverkleuring en je kritiek op mijn concepten. Ook Cees van den Berg dank ik voor kritische kanttekeningen en literatuurtips. Folkert, bedankt voor de gedane experimenten. In dit dankwoord wil ik verder graag Jan Bakker, Sas Dijk, Ellen van Dijk, Frans Flentge, Robby Gangadien, Hillie Groendijk, Tineke Koch, Jan van der Kuil, Wieke van der Meer, Greet Popken, Tineke Sebens en Kor Venema noemen.

Joan en Chris, jullie hebben me voor het leven een rugzakje meegegeven. Deze raakt steeds beter gevuld, maar wordt toch steeds lichter.

Dank je Saskia, voor de momenten dat het rugzakje te zwaar werd en je hem even overnam.